TREK DIAGNOSTIC SYSTEMS
MAGELLAN BIOSCIENCES

INDEX, ÍNDICE, INDICE, ÍNDICE	
2 – 7	**English**
8 – 13	**Español**
14 – 19	**Italiano**
20 – 25	**Français**
26 – 31	**Português**
32 – 35	**Symbols** **Símbolos** **Simboli** **Symboles** **Símbolos**

English

VersaTREK® Myco, 7111-42
VersaTREK Myco GS, 7112-42
VersaTREK Myco AS, 7114-42
VersaTREK Myco PVNA, 7113-42
VersaTREK Connector, 7150-44

INTENDED USE
VersaTREK Myco, with VersaTREK Myco GS and either VersaTREK Myco AS or VersaTREK Myco PVNA added, is a selective liquid growth medium for use with either the VersaTREK Instrument or the ESP Culture System II for the culture recovery of mycobacteria from sterile body specimens and from digested-decontaminated clinical specimens.

SUMMARY AND EXPLANATION
The clinical microbiology laboratory may receive a variety of specimens for mycobacterial culture. These may include respiratory specimens, blood and other normally sterile body fluids, urine, stool, tissue, and gastric washes. Conventional culture methods involving digestion and concentration provide detection of mycobacteria; however, results are not available for 2 – 8 weeks. Several additional weeks are required to complete susceptibility testing. Rapid diagnosis of tuberculosis is important for initiation of appropriate drug therapy and institution of measures to prevent the spread of this highly contagious disease. Delayed treatment, in particular of multiple-drug-resistant *M. tuberculosis* (MDR-TB) strains, can result in treatment failure and patient mortality.[2] To address these issues, clinical microbiologists are urged to use the most rapid and sensitive diagnostic tests that provide reliable results. Experts at the Centers for Disease Control (CDC) have made several recommendations regarding mycobacterial testing including the use of both a liquid and a solid medium for mycobacterial culture.[1]

VersaTREK/ESP Culture System II combines a liquid culture medium (VersaTREK Myco), a growth supplement (VersaTREK Myco GS) and, for potentially contaminated specimens, an antibiotic supplement (VersaTREK Myco AS or VersaTREK Myco PVNA) for optimal recovery of mycobacteria, with a detection system that automatically incubates and continuously monitors culture bottles inoculated with specimens suspected of containing mycobacteria. The sponges in the VersaTREK Myco bottles provide a growth support matrix and increase the surface area exposed to headspace oxygen. The technology of the VersaTREK/ESP Culture System II is based on the detection of headspace pressure changes within a sealed bottle. The VersaTREK/ESP Culture System II monitors changes in either gas production or gas consumption due to microbial growth. A special algorithm has been developed for detection of very slow growing mycobacteria.

PRINCIPLES OF THE PROCEDURE
Appropriately prepared specimens are inoculated with a syringe and needle into VersaTREK Myco bottles that have been supplemented with VersaTREK Myco GS and, for potentially contaminated specimens, VersaTREK Myco AS or VersaTREK Myco PVNA. VersaTREK Myco PVNA should be used when delays greater than 8 hours are expected before processing. The VersaTREK Connector is attached to each bottle to establish a sterile monitoring pathway with the VersaTREK/ESP Culture System II instrument. A hydrophobic membrane in the VersaTREK Connector prevents aerosolization. Clinical information is entered into the system computer and the bottle is appropriately placed in the instrument for incubation at 35 – 37 °C under stationary conditions.

VersaTREK/ESP Culture System II detects mycobacterial growth by automatically monitoring (every 24 minutes) the rate of consumption of oxygen within the headspace of the culture bottle and reports that growth response with a visible signal.

REAGENTS
VersaTREK Myco Formula *

(H2O)	Processed Water	11.5 ml
(MDK)	Middlebrook 7H9 Broth	0.56 % w/v
(CAS)	Casitone	0.12 % w/v
(GLY)	Glycerol	0.24 % w/v
(SBC)	Sodium Bicarbonate	0.026 % w/v

VersaTREK Myco also contains sponges.

VersaTREK Myco GS Formula*

(H2O)	Processed Water	50 ml
(BSA)	Bovine Serum Albumin	7.5% w/v
(DEX)	Dextrose	3.0% w/v
(OLA)	Oleic Acid	0.09% v/v
(CAT)	Catalase	0.003% w/v
(NaCl)	Sodium Chloride	1.27% w/v

VersaTREK Myco AS and VersaTREK Myco PVNA contain a lyophilized mixture of antimicrobial agents that are rehydrated to 25 ml.

VersaTREK Myco AS Formula*

(H2O)	Processed Water	25 ml
(PXB)	Polymyxin B	0.02% w/v
(AZL)	Azlocillin	0.0075% w/v
(FOS)	Fosfomycin	0.054% w/v
(NA)	Nalidixic Acid	0.042% w/v
(AMB)	Amphotericin B	0.015% w/v
(STB)	Stabilizer	1% w/v
(FIL)	Filler	7.7% w/v

VersaTREK Myco PVNA Formula*

(H2O)	Processed Water	25 ml
(PXB)	Polymyxin B	0.02% w/v
(NA)	Nalidixic Acid	0.06% w/v
(AMB)	Amphotericin B	0.015% w/v
(VAN)	Vancomycin	0.009% w/v
(SA)	Solubilizing Agent	5% w/v

*Adjusted and/or supplemented to meet performance criteria.

PRECAUTIONS
1. For *In Vitro* Diagnostic Use.

2. Refer to VersaTREK Myco AS or VersaTREK Myco PVNA Material Safety Data Sheets for complete hazard information.

3. WARNING! POTENTIAL INFECTIOUS TEST SPECIMEN. Infectious agents may be present in specimens. Reagents contain material of animal origin and so are potential carriers or transmitters of disease. Follow Universal Precautions and institutional policy in handling and disposing of infectious agents.

4. Working with *M. tuberculosis* grown in culture, the recommendation is for Biosafety Level 3 practices, containment equipment, and facilities.[3]

5. The VersaTREK Connector contains a sharp recessed needle that is sterile upon first removing the seal, but is potentially contaminated upon termination of use.

Follow institutional policy for handling and disposing of blood-contaminated devices. (Do not handle in a casual manner. Sterilize prior to disposal. Dispose in an approved sharps container. Do not reuse.)

6. Visually inspect all bottles for contamination, cracks, or other signs of deterioration. Do not use bottles that appear turbid or damaged.

7. Use only needle locking syringes.

8. Autoclave all VersaTREK Myco bottles prior to disposal.

9. If seal is broken, DO NOT USE VersaTREK connector and discard in sharps container.

STORAGE
VersaTREK Myco: Store at 15-30°C. Protect from light. DO NOT FREEZE. Broth should appear colorless; do not use if turbid.

VersaTREK Myco GS: Store at 2-8°C. Protect from light.

VersaTREK Myco AS and VersaTREK Myco PVNA: Store at 2-8°C. Upon rehydration, store at 2-8°C and use within 5 days or aliquot, store at -20°C and use within 3 months. Once thawed, do not refreeze.

SPECIMEN COLLECTION PRINCIPLES
Specimens from the following sources were used during the clinical evaluation of the VersaTREK/ESP Culture System II: respiratory (including sputum, lavage, etc.), body fluids (such as CSF, synovial fluid, pleural fluid, etc.), urine, stool, gastric aspirates, tissues, blood, and bone marrow. Collect and process specimens from different body sites as described in *Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory*[3] and in the *Clinical Microbiology Procedures Handbook*[4] or as described in your laboratory procedure manual.

Note: Blood and bone marrow specimens must be processed using one of the following procedures before inoculating VersaTREK Myco bottles:

1. Isolator tubes: Follow the Isolator manufacturer's directions for lysis and concentration. Inoculate VersaTREK Myco with 1 ml of sediment.

2. Distilled water lysis of whole blood cells:
a. Collect 5-10 ml whole blood into a sterile Vacutainer tube containingSodium Polyanetholesulfonate (SPS) or heparin. (A minimum specimen of at least 5 ml is preferred.) Invert the tube several times.
b. Transfer the total specimen to a conical 50 ml centrifuge tube.
c. Add sterile distilled water to the 40 ml mark on the tube. This will cause lysis of the cells.
d. Centrifuge at 3000 x g for 20 minutes. Decant the supernatant.
e. Add 1-2 ml of phosphate buffer to the sediment. Use 1 ml of the resulting specimen to inoculate VersaTREK Myco (#7 below).

3. Buffy coat procedure:
a. Use only blood received in tubes containing SPS or heparin. Tubes containing Edetic Acid (EDTA) are unacceptable because even trace amounts of EDTA inhibit mycobacterial growth.
b. Spin the tube at 1000 RPM for 10 minutes.
c. Using a pipette, remove the buffy coat and as small an amount of red blood cells as possible. Place in a sterile tube. Use 1 ml of the buffy coat to inoculate VersaTREK Myco (#7 below).

PROCEDURE
Materials Provided:
VersaTREK Myco
VersaTREK Myco GS
VersaTREK Myco AS or VersaTREK Myco PVNA
VersaTREK Connector

Materials Required But Not Provided:
Sterile distilled or deionized water
Middlebrook 7H10 or other mycobacterial agar or egg-based medium
Autoclave
N-acetyl-L-cysteine powder
Sterile 0.067 M phosphate buffer, pH 6.8
Centrifuge
CO_2 incubator, 37°C
Sterile tuberculin syringes with permanently attached needles
Sterile Pipettes (optional)
Mycobactericidal disinfectant (e.g., Amphyl™, OMNI™, etc.)
Alcohol swabs
Vortex mixer
Sterile 50 ml conical polypropylene centrifuge tubes
Biological safety cabinet
Microscope
Materials for staining slides
Quality Control organisms:

M.tuberculosis ATCC® 25177	*M.kansasii* ATCC 12478
M.fortuitum ATCC 6841	*M.scrofulaceum* ATCC 19981
M.intracellulare ATCC 13950	

Inoculation of VersaTREK Myco Culture Bottles
1. Disinfect the VersaTREK Myco AS or VersaTREK Myco PVNA bottle stopper with alcohol.

2. Aseptically reconstitute VersaTREK Myco AS or VersaTREK Myco PVNA by injecting 25 ml sterile distilled or deionized water through the disinfected septum using a needle and syringe. There will be enough reagent for 50 bottles.

3. Label the VersaTREK Myco culture bottle with patient information.

4. Disinfect the bottle stopper with alcohol.

5. Aseptically add 1 ml of VersaTREK Myco GS by injecting through the septum with a needle and syringe.

6. Aseptically add 0.5 ml of VersaTREK Myco AS or VersaTREK Myco PVNA solution by injecting through the septum with a needle and syringe.

7. Add up to 1 ml of concentrated clinical specimen with a needle and syringe.
NOTE: Significant overfilling of the bottle may cause false positive results and, in the case of blood specimens from Isolator tubes, may cause inhibition of growth.

Inoculate 0.1 ml of specimen on a Middlebrook 7H10 agar plate or other mycobacterial solid agar or egg-based medium.[1]

NOTE: Alternatively, steps 2 and 5-7 may be performed by opening the bottles and adding the reagents and sample using sterile pipettes. Care must be taken to maintain aseptic technique. The stopper and cap must be reseated properly to guarantee a sealed system. If the stopper and cap are not seated properly, a leak bottle error will occur.

8. Wipe the culture bottle and stopper with mycobactericidal disinfectant.

9. Mix by inverting several times.

10. Remove the seal from the bottom of a VersaTREK Connector. Place the needle end of the connector over the culture bottle neck and press vertically down to puncture the culture bottle stopper.

NOTE: Do not invert the culture bottle while the VersaTREK Connector is on the bottle. Fluid in the needle may interfere with the pressure readings for the bottle.

11. Record the desired patient information in the VersaTREK/ESP Culture System II computer.

12. Place the culture bottle with VersaTREK Connector into the instrument.

13. When the instrument indicates via a steady red light that a particular bottle location contains a positive culture, remove the bottle according to the procedures specified in the VersaTREK/ESP Culture System II Operator's Manual.

14. Allow the bottle to vent through the VersaTREK Connector. In a biological safety cabinet, remove the VersaTREK Connector from the bottle and dispose of it in an approved sharps infectious waste container.

15. Vortex the specimen thoroughly to dislodge organisms from the sponge.

16. After the bottle stopper has been disinfected, obtain specimens for acid-fast staining and subculture using a syringe and needle. If acid-fast organisms are found on the smear, proceed with organism identification. If no organisms are seen on the smear, attach a new VersaTREK Connector, return the bottle to the VersaTREK/ESP Culture System II Instrument and continue incubation. If non-acid-fast organisms are seen on the smear, the bottle contents may be reprocessed through another decontamination procedure and inoculated into a fresh VersaTREK Myco bottle, or discarded and another specimen requested.

17. Organism identification may be determined using nucleic acid probes (AccuProbe). Remove 1.0 ml from a well mixed VersaTREK bottle, centrifuge at 3500 x g for 15 minutes to concentrate the growth. (If the isolate is from a blood culture, the pellet should be resuspended in 0.67M phosphate buffer pH 6.8, vortexed and recentrifuged. This should be repeated until the supernatant is clear.) Resuspend pellets with 7H9 broth to a McFarland 1 equivalent and assay using the AccuProbe (GenProbe, San Diego, CA) kit following manufacturer's instructions for broth culture method. It is recommended that if the RLU value falls within the equivocal range (10,000-29,000 RLUs), the specimen is retested.

18. At the end of the incubation period (6 weeks or as defined by your laboratory procedure manual), a bottle not exhibiting a positive growth response should be visually inspected for turbidity. If the bottle is turbid, obtain a sample for acid-fast staining and subculture as described above. If evidence of turbidity is lacking, the bottle may be discarded. Sterilize bottle contents prior to disposal.

RESULTS

The detection of microbial growth in the VersaTREK/ESP Culture System II is based on the sensitive measurement of gas production and/or gas consumption within the headspace of a sealed culture bottle. This information is used to generate a curve for each bottle. An internal algorithm analyzes the information to determine the status of each specimen. When a certain set of conditions is met, a bottle is flagged as positive. There are approximately 10^6 CFU/ml of mycobacteria at the time of detection.

TABLE 1. REPORTING RESULTS.

Bottle and Smear Status	Report
Signal+ Acid-Fast Bacilli + (AFB+)	AFB positive; identification pending
Signal+ AFB -	No report; or specimen contaminated with non-mycobacterial organisms; unable to determine presence/absence of AFB

QUALITY CONTROL

A Certificate of Analysis is included with each lot of VersaTREK Myco. Each lot conforms to TREK's quality assurance criteria. If desired, the procedure below can be followed for additional testing.

1. Add 1 ml VersaTREK Myco GS and 0.5 ml rehydrated VersaTREK Myco AS or VersaTREK Myco PVNA to a VersaTREK Myco culture bottle.

2. QC organisms may be used from frozen aliquots or solid medium. Prepare a suspension in sterile 0.85% saline equivalent to a McFarland standard No.1 (approximately 10^7 CFU/ml). Allow clumps of organism to settle for 30 minutes. Dilute the organism to 10^4 CFU/ml in sterile saline. Inoculate the bottle with 1 ml of diluted organism.

TABLE 2. EXPECTED QC RESULTS.

Organism	ATCC®	CFU/ ml	Days to Positive	Organism	ATCC	CFU/ ml	Days to Positive
M. tuberculosis	25177	10^4	<14	*M. kansasii*	12478	10^4	<14
M. fortuitium	6841	10^4	<14	*M. scrofulaceum*	19981	10^4	<14
M. intracellulare	13950	10^4	<14				

LIMITATIONS

1. Recovery of mycobacteria in the VersaTREK Myco bottle is dependent on the quality of specimen collected, the numbers of culturable organisms in the specimen volume, and the method of processing. Adherence to procedural instructions is critical for optimum recovery of mycobacteria. Contamination with saprophytic mycobacteria in tap water or other laboratory reagents and equipment may cause positive results (recovery of environmental bacteria not in the clinical specimen).

2. Decontamination by the N-Acetyl-L-Cysteine-Sodium Hydroxide (NALC-NaOH) or Oxalic Acid method is recommended. Other decontamination methods have not been tested in conjunction with VersaTREK Myco culture medium. Digestant decontaminants may have harmful effects on mycobacteria.

3. Mycobacteria may vary in acid-fastness depending on strain, age of culture and other variables. All bottles with a positive VersaTREK/ESP Culture System II signal or appearing turbid should be subcultured to both selective and non-selective mycobacterial media. Non-mycobacterial species may overgrow mycobacteria present. Such culture bottles should be decontaminated and recultured.

4. VersaTREK Myco bottles with a positive signal may contain one or more species of mycobacteria and/or other non-mycobacterial species. Identification of mycobacteria present requires subculture and additional procedures to identify organisms present. The consistency of microscopic morphology in VersaTREK Myco bottles has not been established.

5. VersaTREK Myco bottles are incubated at 35 – 37 °C, potentially precluding the recovery of mycobacteria requiring other incubation temperatures (e.g., *M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. haemophilum*). Recovery of such organisms requires additional culture methods. Organisms with special growth requirements (e.g., *M. haemophilum*) may not be recovered in VersaTREK Myco when incubated at the appropriate temperature. The following isolates have been recovered either in clinical studies or analytical studies: *M. tuberculosis*, *M. avium-intracellulare*, *M. kansasii*, *M. fortuitum*, *M. bovis*, *M. chelonae*, *M. gordonae*, *M. scrofulaceum*, *M. xenopi*, *M. szulgai*, *M. phlei*, *M. smegmatis*, *M. simiae*, *M. marinum*, *M. malmoense*.

6. Inversion of the VersaTREK Myco bottles after attachment of the VersaTREK Connector may interfere with the pressure readings for the bottle and is not recommended.

7. Results from the AccuProbe should be interpreted in conjunction with other laboratory and clinical data available to the clinician. A positive AccuProbe result does not rule out a mixed mycobacteria culture.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

VersaTREK/ESP Culture System II permits recovery of mycobacteria from clinical specimens. Isolation of mycobacteria in the VersaTREK/ESP Culture System II from 3001 specimens was compared to the BACTEC 460 radiometric broth system in a multi-center study. A subset of the total (2805 specimens) was also compared to conventional egg and agar-based media. The laboratories participating in the study were geographically distributed throughout the United States and included large and small teaching and private hospitals with varying patient populations (including AIDS and Cystic Fibrosis patients). A total of 363 specimens were positive in the VersaTREK/ESP Culture System II/BACTEC 460 comparison representing a positivity rate of 12%. Of these positive cultures, 306 (84%) were recovered in the VersaTREK/ESP Culture System II Instrument and 268 (74%) were recovered in the BACTEC system. In the comparison, all of conventional solid media combined detected 92% of the specimens that grew mycobacteria.

The VersaTREK/ESP Culture System II Instrument demonstrated a 1.1% false positive (signal positive, no organisms seen) and a 0.6% false negative rate (signal negative, subculture AFB positive). The false negative rate is based upon the staining and/or subculturing of all specimens positive by any method plus 10% of the specimens negative by all three methods. The initial contamination rate was 8.8% and the final was 4.2%.

Positive specimens were distributed among the following specimen sources: respiratory (72%), blood (15%), stool (5%), tissue (3.6%), sterile fluids (2.2%), urine (1.4%), and wound (0.8%).

The use of nucleic acid probes for mycobacteria identification directly from a positive VersaTREK Myco bottle has been shown to be accurate and reliable.[5] Positive VersaTREK Myco bottles (n=360) were tested with two AccuProbe probes on the day of positivity as described under Procedure. The probes used were determined by pellet pigmentation. A buff colored pellet was tested with probes specific for *M. tuberculosis* complex and *M. avium* complex (MAC), while a chromogenic pellet was tested with probes specific for MAC and *M. gordonae*. Bottles yielding equivocal probe results were incubated at 35°C for 1 – 3 days before a repeat probe was performed. Results of the study are shown in Table 4. Seven isolates were negative for all probes used and were ultimately identified as other mycobacteria species.

TABLE 3. SUMMARY OF CLINICAL RESULTS.

		Microorganisms Recovered by:				
Mycobacterium SPECIES	**TOTAL ISOLATES[a]**	**TOTAL VersaTREK/ ESP[b]**	**VersaTREK/ ESP, BACTEC, and SOLID**	**VersaTREK/ ESP ONLY**	**BACTEC ONLY**	**SOLID ONLY**
M. tuberculosis	68	62	52	1	1	4
M. avium-intracellulare	170	159	89	36[c,d]	2	3
M. kansasii	7	7	5	0	0	1
M. fortuitum	5	3	0	2	0	1
M. bovis	1	1	1	0	0	0
M. chelonae	9	8	4	0	0	0
M. gordonae	30	20	3	10[d]	0	4
M. scrofulaceum	1	0	0	0	0	1
M. xenopi	6	6	2	0	2	0
M. szulgai	3	3	3	0	0	0
M. species (other)	8	7	1	2	1	1
TOTAL	**308**	**276**	**160**	**51[c, d]**	**6**	**15**

a. The number of organisms recovered by any method from specimens tested by all three methods.
b. The total number of organisms recovered in the VersaTREK/ESP Culture System II.
c. p <0.05 for comparison between VersaTREK/ESP and BACTEC using the McNemar modification of the chi-square test.
d. p <0.05 for comparison between VersaTREK/ESP and solid media using the McNemar modification of the chi-square test.

TABLE 4. DIRECT TESTING OF POSITIVE VERSATREK/ESP MYCO BOTTLES WITH ACCUPROBES[a]

Organism	**Total**	**Initial Probe Positive**	**Initial Probe Equivocal**	**Initial Probe Negative**	**Probe Positive After Retest[b]**
M. avium complex					
Blood specimens	51	43 (84.3%)	8 (15.7%)	0	51 (100%)
Other specimens	226	199 (88.1%)	24 (10.6%)	3 (1.3%)	226 (100%)
M. tuberculosis complex					
Blood specimens	1	1 (100%)	0	0	1 (100%)
Other specimens	37	29 (78.4%)	6 (16.2%)	2 (5.4%)	37 (100%)
M. gordonae	38	37 (97.4%)	1 (2.6%)	0	38 (100%)
TOTAL	**353**	**310**	**38**	**5**	**353**

a. GenProbe, San Diego, CA
b. Multiple retests were required for a final identification of some isolates. For MAC specimens from blood, 1.96%. For MAC specimens from sources other than blood, 1.33%. For *M. tuberculosis* specimens from sources other than blood, 5.4%.

HAZARD INFORMATION

VersaTREK Myco PVNA

Xn Harmful
R42/43 May cause sensitization by inhalation and skin contact.
S26 In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice.
S36 Wear suitable protective clothing.

VersaTREK Myco AS

Xn Harmful
R42/43 May cause sensitization by inhalation and skin contact.
R48/23/24/25 Toxic: danger of serious damage to health by prolonged exposure through inhalation, in contact with skin and if swallowed.
R45 May cause cancer.
S7 Keep container tightly closed.
S22 Do not breathe dust.
S24/25 Avoid contact with skin and eyes.
S26 In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice.
S36 Wear suitable protective clothing.
S45 In case of accident or if you feel unwell, seek medical advice immediately (show the label where possible).

REFERENCES

1. Tenover, F.C., J.T. Crawford, R.E. Huebner, L.J. Geiter, C.R Horsburgh, Jr., and R.C. Good. 1993. The resurgence of tuberculosis: Is your laboratory ready? J. Clin. Microbiol. 31:767-770.
2. Stratton, C.W. 1992. The resurgence of tuberculosis. Inf. Dis. Newsl. 11:73-80.
3. Kent, P.T., and G.P. Kubica. 1985. Public health mycobacteriology: A guide for the level III laboratory. USDHHS, Centers for Disease Control, Atlanta, GA.
4. Master, R.M. 1992. Clinical microbiology procedures handbook. Coordinating ed., HD Isenberg. American Society for Microbiology, Washington, DC.
5. LaBombardi, V.J., L. Carter, and S. Massarella. 1997. Use of nucleic acid probes to identify mycobacteria directly from Difco ESP-Myco bottles. J. Clin. Microbiol. 35:1002-1004.

TREK DIAGNOSTIC SYSTEMS
MAGELLAN BIOSCIENCES

For additional information call TREK Technical Support at 1.800.642.7029.

TREK Diagnostic Systems
982 Keynote Circle, Suite 6
Cleveland, Ohio 44131
800.871.8909

EC REP

TREK Diagnostic Systems
Units 17 – 19, Birches Industrial Estate
East Grinstead
West Sussex, RH19 1XZ
UK

L-TDST013-8
2010-02

Español

VersaTREK® Myco, 7111-42
VersaTREK Myco GS, 7112-42
VersaTREK Myco AS, 7114-42
VersaTREK Myco PVNA, 7113-42
VersaTREK Connector, 7150-44

APLICACIONES PREVISTAS
VersaTREK Myco y VersaTREK Myco GS, junto con VersaTREK Myco AS o VersaTREK Myco PVNA, es un caldo de cultivo selectivo para ser utilizado con el instrumento del VersaTREK o el ESP Culture System II para la recuperación de micobacterias de muestras corporales estériles y de muestras clínicas digeridas y descontaminadas.

RESUMEN Y DESCRIPCIÓN
El laboratorio de microbiología clínica puede recibir varias muestras de cultivos de micobacterias. Estos cultivos pueden incluir muestras del aparato respiratorio, sangre y otros fluidos corporales generalmente estériles, orina, heces, tejidos y lavados gástricos. Los métodos convencionales de cultivo que implican la digestión y concentración permiten la detección de micobacterias. Sin embargo, los resultados no están disponibles antes de 2 - 8 semanas. Son necesarias varias semanas adicionales para completar las pruebas de sensibilidad. El diagnóstico rápido de la tuberculosis es importante para iniciar el tratamiento farmacológico adecuado y para el establecimiento de medidas para evitar la propagación de esta enfermedad altamente contagiosa. Un retraso en el tratamiento, en especial para las cepas de *M. tuberculosis* (MDR-TB) resistentes a múltiples fármacos, puede ocasionar un fallo del tratamiento y la muerte de los pacientes.[2] Para solucionar estos problemas, se insta a los microbiólogos clínicos a que utilicen las pruebas de diagnóstico más rápidas y sensibles que permitan ofrecer resultados fiables. Los expertos de los Centros para el Control de Enfermedades (CDC) han realizado varias recomendaciones sobre las pruebas de micobacterias, y han incluido el uso de medios de cultivo líquidos y sólidos para el cultivo de micobacterias.[1]

VersaTREK/ESP Culture System II combina un caldo de cultivo líquido (VersaTREK Myco), un suplemento de crecimiento (VersaTREK Myco GS) y - para muestras potencialmente contaminadas - un suplemento antibiótico (VersaTREK Myco AS o VersaTREK Myco PVNA) para la recuperación óptima de micobacterias, con un sistema de detección que incuba automáticamente y monitoriza de forma continua los frascos de cultivo inoculados con muestras sospechosas de contener micobacterias. Las esponjas en los frascos VersaTREK Myco proporcionan una matriz de soporte del crecimiento y aumentan el área de superficie expuesta al oxígeno del espacio de aire. La tecnología del VersaTREK/ESP Culture System II está basada en la detección de los cambios de presión del espacio de aire en el interior de un frasco hermético. El VersaTREK/ESP Culture System II monitoriza los cambios en la producción o en el consumo de gas debido al crecimiento microbiano. Se ha desarrollado un algoritmo especial para la detección de micobacterias de crecimiento muy lento.

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO
Las muestras debidamente preparadas se inoculan con una jeringuilla y aguja en los frascos VersaTREK Myco que incluyen VersaTREK Myco GS y VersaTREK Myco AS o VersaTREK Myco PVNA para muestras potencialmente contaminadas. VersaTREK Myco PVNA debe utilizarse cuando está previsto un retraso superior a 8 horas antes del procesamiento. El VersaTREK Connector se fija a cada frasco para establecer una ruta de monitorización estéril con el instrumento del VersaTREK/ESP Culture System II. Una membrana hidrófoba en el VersaTREK Connector evita la formación de aerosol. La información clínica se introduce en el ordenador del sistema y el frasco se coloca adecuadamente en el instrumento para una incubación a 35 – 37 °C en condiciones estacionarias.

El VersaTREK/ESP Culture System II detecta el crecimiento de micobacterias monitorizando automáticamente (cada 24 minutos) el porcentaje de consumo de oxígeno en el interior del espacio de aire del frasco de cultivo, y notifica la respuesta de crecimiento con una señal visible.

REACTIVOS
Fórmula de VersaTREK Myco *

(H2O)	Agua procesada	11,5 ml
(MDK)	Caldo Middlebrook 7H9	0,56 % w/v
(CAS)	Casitona	0,12 % w/v
(GLY)	Glicerol	0,24 % w/v
(SBC)	Bicarbonato sódico	0,026 % w/v

VersaTREK Myco también contiene esponjas.

Fórmula de **VersaTREK Myco GS ***

(H2O)	Agua procesada	50 ml
(BSA)	Albúmina de suero bovino	7,5% w/v
(DEX)	Dextrosa	3,0% w/v
(OLA)	Ácido oleico	0,09% v/v
(CAT)	Catalasa	0,003% w/v
(NaCl)	Cloruro sódico	1,27% w/v

VersaTREK Myco AS y VersaTREK Myco PVNA contienen una mezcla liofilizada de agentes antimicrobianos que son rehidratados hasta 25 ml.

Fórmula de VersaTREK Myco AS *

(H2O)	Agua procesada	25 ml
(PXB)	Polimixina B	0,02% w/v
(AZL)	Azlocilina	0,0075% w/v
(FOS)	Fosfomicina	0,054% w/v
(NA)	Ácido nalidíxico	0,042% w/v
(AMB)	Anfotericina B	0,015% w/v
(STB)	Estabilizante	1% w/v
(FIL)	Relleno	7,7% w/v

Fórmula de VersaTREK Myco PVNA *

(H2O)	Agua procesada	25 ml
(PXB)	Polimixina B	0,02% w/v
(NA)	Ácido nalidíxico	0,06% w/v
(AMB)	Anfotericina B	0,015% w/v
(VAN)	Vancomicina	0,009% w/v
(SA)	Agente solubilizante	5% w/v

*Ajustado y/o suplementado para cumplir los criterios de rendimiento.

PRECAUCIONES
1. Para aplicaciones de diagnóstico in vitro.

2. Consulte la documentación de seguridad del VersaTREK Myco AS o VersaTREK Myco PVNA para obtener información completa de los riesgos.

3. ¡ADVERTENCIA! MUESTRA DE PRUEBA POTENCIALMENTE INFECCIOSA.
Las muestras pueden contener agentes infecciosos. Los reactivos contienen material de origen animal, por lo que son posibles portadores o transmisores de enfermedades. Siga las precauciones universales y la normativa del centro a la hora de manipular y desechar los agentes infecciosos.

4. Si se trabaja con *M. tuberculosis* en cultivos, se recomiendan las prácticas, equipos de contención e instalaciones de nivel 3 sobre seguridad biológica.[3]

5. El VersaTREK Connector contiene una aguja embutida y afilada, esterilizada hasta que se retira el precinto pero que se puede contaminar después del uso.

Cumpla las normas de trabajo para la manipulación y eliminación de dispositivos contaminados con sangre. (No manipule los instrumentos de forma despreocupada. Realice una esterilización antes de desechar. Deseche en un contenedor autorizado. No vuelva a utilizar los dispositivos).

6. Verifique visualmente todos los frascos en busca de contaminación, grietas u otros signos de deterioro. No utilice frascos que estén turbios o dañados.

7. Utilice sólo jeringuillas con bloque de aguja.

8. Esterilice en el autoclave todos los frascos de VersaTREK Myco antes de desecharlos.

9. Si la junta está rota, NO UTILICE el VersaTREK Connector y deséchelo en un contenedor.

ALMACENAMIENTO
VersaTREK Myco: Guarde a 15-30°C. Proteja de la luz. NO LO CONGELE. El caldo de cultivo debe ser incoloro; no lo utilice si está turbio.

VersaTREK Myco GS: Guarde a 2-8°C. Proteja de la luz.

VersaTREK Myco AS y VersaTREK Myco PVNA: Guarde a 2-8°C. Después de la rehidratación, guarde a 2-8°C y use antes de 5 días; si es alícuota, guarde a -20°C y use antes de 3 meses. Una vez descongelado, no lo vuelva a congelar.

PRINCIPIOS DE RECOGIDA DE MUESTRAS
Se utilizaron muestras del siguiente origen durante la evaluación clínica del VersaTREK/ESP Culture System II: aparato respiratorio (incluidos esputo, lavado, etc.), fluidos corporales (tales como CSF, líquido sinovial, líquido pleural, etc.), orina, heces, aspirados gástricos, tejidos, sangre y médula ósea. Recoja y procese las muestras de diferentes partes corporales según se describe en la guía *Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory*[3] y en el manual *Clinical Microbiology Procedures Handbook*[4] o según el manual de procedimiento de su laboratorio.

Nota: Las muestras de sangre y médula ósea deben ser procesadas mediante uno de los siguientes procedimientos antes de inocular frascos VersaTREK Myco:

1. Tubos Isolator: Siga las instrucciones del fabricante de Isolator para lisis y concentración. Inocule VersaTREK Myco con 1 ml de sedimento.

2. Lisis de agua destilada de células sanguíneas completas:
a. Extraiga de 5 – 10 ml de sangre completa en un tubo Vacutainer que contenga polianetolsulfonato de sodio (SPS) o heparina. (Se recomienda una muestra mínima de al menos 5 ml.) Invierta el tubo varias veces.
b. Transfiera toda la muestra a un tubo centrifugador cónico de 50 ml.
c. Añada agua destilada estéril hasta la marca de 40-ml en el tubo, lo que provocará la lisis de las células.
d. Centrifugue a 3000 x g durante 20 minutos. Decante el sobrenadante.
e. Añada de 1 a 2 ml de tampón de fosfato en el sedimento. Use 1 ml de la muestra resultante para inocular VersaTREK Myco (punto #7 a continuación).

3. Procedimiento de capa leucocitaria:
a. Use sólo sangre recibida en tubos que contengan SPS o heparina. Los tubos que contengan ácido edético (EDTA) no son aceptables porque incluso trazas de EDTA inhiben el crecimiento de micobacterias.
b. Haga girar el tubo a 1000 RPM durante 10 minutos.
c. Con una pipeta, retire la capa leucocitaria y la cantidad más pequeña de hematíes posible. Póngala en un tubo estéril. Use 1 ml de la capa leucocitaria para inocular VersaTREK Myco (punto #7 a continuación).

PROCEDIMIENTO
Materiales suministrados**:**
VersaTREK Myco
VersaTREK Myco GS
VersaTREK Myco AS o VersaTREK Myco PVNA
VersaTREK Connector

Materiales necesarios pero no suministrados:
Agua destilada o desionizada estéril
Middlebrook 7H10 u otro agar micobacteriano o caldo de cultivo basado en huevos
Autoclave
Polvo N-acetil-L-cisteína
Tampón de fosfato estéril 0,067 M, pH 6,8
Centrifugador
Incubadora CO_2, 37°C
Jeringuillas de tuberculina estériles con agujas permanentemente colocadas
Pipetas estériles (opcional)
Desinfectante micobactericida (ej.: Amphyl™, OMNI™, etc.)
Tampones de alcohol
Mezclador de vórtice
Tubos centrifugadores cónicos estériles de polipropileno 50-ml
Armazón de seguridad biológica
Microscopio
Materiales para muestras de tinción
Organismos de control de calidad:

M.tuberculosis ATCC® 25177	*M.kansasii* ATCC 12478
M.fortuitum ATCC 6841	*M.scrofulaceum* ATCC 19981
M.intracellulare ATCC 13950	

Inoculación de frascos de cultivo VersaTREK Myco
1. Desinfecte el tapón del frasco VersaTREK Myco AS o VersaTREK Myco PVNA con alcohol.

2. Reconstituya asépticamente VersaTREK Myco AS o VersaTREK Myco PVNA inyectando 25 ml de agua destilada o desionizada estéril a través del septo desinfectado con una aguja y jeringuilla. Habrá suficiente reactivo para 50 frascos.

3. Etiquete el frasco de cultivo VersaTREK Myco con la información del paciente.

4. Desinfecte el tapón del frasco con alcohol.

5. Añada asépticamente 1 ml de VersaTREK Myco GS inyectando a través del septo con una aguja y jeringuilla.

6. Añada asépticamente 0,5 ml de solución VersaTREK Myco AS o VersaTREK Myco PVNA inyectando a través del septo con una aguja y jeringuilla.

7. Añada hasta 1 ml de muestra clínica concentrada con una aguja y jeringuilla.
NOTA: Un llenado excesivo del frasco puede provocar falsos resultados positivos y, en el caso de muestras sanguíneas en tubos Isolator, puede ocasionar una inhibición del crecimiento.

Inocule 0,1 ml de muestra en una placa de agar Middlebrook 7H10 o en otro agar sólido micobacteriano o caldo de cultivo basado en huevos.[1]

NOTA: Alternativamente, los pasos 2 y 5-7 pueden efectuarse abriendo los frascos y agregando los reactivos y la muestra mediante pipetas estériles. Se debe tener cuidado de mantener una técnica aséptica. El tapón y el capuchón deben recolocarse adecuadamente para garantizar un sistema hermético. Si el tapón y el capuchón no están colocados correctamente, se producirá un error de pérdida en el frasco.

8. Limpie el frasco y el tapón con desinfectante micobactericida.

9. Mezcle invirtiendo varias veces.

10. Extraiga la junta de la parte inferior de un VersaTREK Connector. Ponga el extremo de la aguja del VersaTREK Connector sobre el cuello del frasco de cultivo y presione verticalmente hacia abajo hasta perforar el tapón del frasco de cultivo.

NOTA: no invierta el frasco de cultivo mientras el VersaTREK Connector esté en el frasco. El líquido en la aguja puede interferir en las lecturas de presión del frasco.

11. Registre la información del paciente en el ordenador del VersaTREK/ESP Culture System II.

12. Ponga el frasco de cultivo con el VersaTREK Connector en el instrumento.

13. Cuando el instrumento indique con una luz roja estable que una ubicación específica del frasco contiene un cultivo positivo, retire el frasco según los procedimientos especificados en el Manual del operario del VersaTREK/ESP Culture System II.

14. Deje purgar el frasco a través del VersaTREK Connector. En un armazón de seguridad biológica, retire el VersaTREK Connector del frasco y deséchelo en un contenedor de desechos infecciosos autorizado.

15. Ponga la muestra en un mezclador de vórtice para extraer los organismos de la esponja.

16. Cuando se haya desinfectado el tapón del frasco, obtenga muestras para tinciones ácido-alcohol resistentes y subcultivos por medio de una jeringuilla y aguja. Si se encuentran organismos ácido-alcohol resistentes en el frotis, continúe con la identificación de organismos. Si no se encuentran organismos en el frotis, ponga un nuevo VersaTREK Connector, vuelva a colocar el frasco en el instrumento VersaTREK/ESP Culture System II y siga con la incubación. Si no encuentran organismos ácido-alcohol resistentes en el frotis, el contenido del frasco puede volver a procesarse mediante otro procedimiento de descontaminación e inocularse en un nuevo frasco VersaTREK Myco, o bien se puede desechar y solicitar otra muestra.

17. La identificación de organismos se puede determinar utilizando probetas de ácido nucleico (AccuProbe). Extraiga 1,0 ml de un frasco bien mezclado de VersaTREK, centrifugue a 3500 x g durante 15 minutos para concentrar el crecimiento (si se aísla desde un cultivo sanguíneo, el gránulo puede volver a suspenderse en un tampón de fosfato 0,67M, pH 6,8, y mezclarse en vórtice y recentrifugarse; esto debe repetirse hasta que el sobrenadante sea claro). Vuelva a suspender los gránulos con caldo de cultivo 7H9 hasta un equivalente McFarland 1 y analice con el kit AccuProbe (GenProbe, San Diego, CA) según las instrucciones del fabricante sobre el método de cultivo. Se recomienda repetir la prueba de la muestra si el valor RLU está en el intervalo equívoco (10,000-29,000 RLUs).

18. Al final del período de incubación (6 semanas o según esté definido en el manual de procedimiento de su laboratorio), se deberá inspeccionar visualmente la turbidez de un frasco que no muestre una respuesta de crecimiento positiva. Si el frasco está turbio, obtenga una muestra de ácido-alcohol resistente y subcultivo según se ha descrito anteriormente. Si no hay signos de turbidez, el frasco se puede desechar. Esterilice el contenido del frasco antes de desecharlo.

RESULTADOS

La detección del crecimiento microbiano en el VersaTREK/ESP Culture System II está basada en la medición sensible de la producción de gas y/o el consumo de gas en el espacio de aire de un frasco de cultivo hermético. Esta información se utiliza para generar una curva para cada frasco. Un algoritmo interno analiza la información para determinar el estado de cada muestra. Cuando se cumplen unas condiciones determinadas, un frasco se etiqueta como positivo. Existen aproximadamente 10^6 CFU/ml de micobacterias en el momento de la detección.

TABLA 1. INFORME DE RESULTADOS.

Frasco y estado del frotis	Informe
Señal+	AFB positivo;
Bacilos ácido-alcohol resistentes + (AFB+)	Pendiente de identificación
Señal+	Sin informe; o muestra contaminada con organismos no micobacterianos;
AFB -	no se puede determinar la presencia/ausencia de AFB

CONTROL DE CALIDAD

Se incluye un Certificado de análisis con cada lote de VersaTREK Myco. Cada lote está en conformidad con los criterios de garantía de calidad de TREK. Si se desea, se puede seguir el procedimiento siguiente para una comprobación adicional.

1. Añada 1 ml de VersaTREK Myco GS y 0,5 ml de VersaTREK Myco AS o VersaTREK Myco PVNA rehidratado en un frasco de cultivo VersaTREK Myco.

2. Pueden utilizarse organismos de control de calidad de alícuotas congelados o medios sólidos. Prepare una suspensión en equivalente salino estéril al 0,85% hasta un estándar McFarland Nº.1 (aproximadamente 10^7 CFU/ml). Deje asentar un conjunto de organismos durante 30 minutos. Diluya el organismo a 10^4 CFU/ml en una solución salina estéril. Inocule el frasco con 1 ml de organismo diluido.

TABLA 2. RESULTADOS PREVISTOS DE CONTROL DE CALIDAD.

Organismo	ATCC®	CFU/ ml	Días hasta positivo	Organismo	ATCC	CFU/ ml	Días hasta positivo
M. tuberculosis	25177	10^4	<14	*M. kansasii*	12478	10^4	<14
M. fortuitium	6841	10^4	<14	*M. scrofulaceum*	19981	10^4	<14
M. intracellulare	13950	10^4	<14				

LIMITACIONES

1. La recuperación de micobacterias en el frasco VersaTREK Myco depende de la calidad de la muestra obtenida, de la cantidad de organismos cultivables en el volumen de muestra y del método de procesamiento. El cumplimiento de las instrucciones del procedimiento es fundamental para la recuperación óptima de micobacterias. La contaminación con micobacterias saprofíticas del agua del grifo u otros reactivos y equipos de laboratorio pueden ocasionar resultados positivos (recuperación de bacterias ambientales que no están en la muestra clínica).

2. Se recomienda la descontaminación mediante el método de hidróxido de sodio N-Acetil-L-cisteína (NALC-NaOH) o ácido oxálico. No se han comprobado otros métodos de descontaminación en conjunción con el caldo de cultivo VersaTREK Myco. Los descontaminantes digestivos pueden tener efectos dañinos en las micobacterias.

3. Las micobacterias pueden variar en la resistencia al ácido según la cepa, la edad del cultivo y otras variables. Todos los frascos con una señal positiva del VersaTREK/ESP Culture System II o cuyo aspecto sea turbio deben ser subcultivados en medios micobacterianos selectivos y no selectivos. Las especies no micobacterianas pueden hacer crecer en exceso las micobacterias presentes. Estos frascos de cultivo deben ser descontaminados y recultivados.

4. Los frascos VersaTREK Myco con una señal positiva pueden contener una o más especies de micobacterias y/o otras especies no micobacterianas. La identificación de las micobacterias presentes requiere un subcultivo y procedimientos adicionales para identificar los organismos presentes. La uniformidad de la morfología microscópica en los frascos VersaTREK Myco no ha sido demostrada.

5. Los frascos VersaTREK Myco se incuban a 35 – 37 °C, excluyendo potencialmente la recuperación de micobacterias que requieren otras temperaturas de incubación (ej.: *M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. haemophilum*). La recuperación de estos organismos requiere utilizar métodos de cultivo adicionales. Es posible que los organismos con requisitos especiales de crecimiento (ej.: *M. haemophilum*) no sean recuperados en VersaTREK Myco cuando se incuban a la temperatura adecuada. Los siguientes organismos aislados han sido recuperados en estudios clínicos o analíticos: *M. tuberculosis*, *M. avium-intracellulare*, *M. kansasii*, *M. fortuitum*, *M. bovis*, *M. chelonae*, *M. gordonae*, *M. scrofulaceum*, *M. xenopi*, *M. szulgai*, *M. phlei*, *M. smegmatis*, *M. simiae*, *M. marinum*, *M. malmoense*.

6. La inversión de los frascos VersaTREK Myco tras la colocación del VersaTREK Connector puede interferir en las lecturas de presión del frasco, por lo que no se recomienda.

7. Los resultados del AccuProbe deben ser interpretados junto con otros datos clínicos y de laboratorio que disponga el investigador clínico. Un resultado positivo del AccuProbe no excluye un cultivo de micobacterias mezcladas.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

VersaTREK/ESP Culture System II permite la recuperación de micobacterias de muestras clínicas. El aislamiento de micobacterias en el VersaTREK/ESP Culture System II a partir de 3001 muestras fue comparado con el sistema de caldo radiométrico BACTEC 460 en un estudio desarrollado en varios centros. Un subconjunto del total (2805 muestras) también fue comparado con medios convencionales basados en agar y huevos. Los laboratorios que participaron en el estudio estaban distribuidos geográficamente por todos los Estados Unidos e incluían hospitales privados y de prácticas con diferentes poblaciones de pacientes (incluyendo pacientes con SIDA y fibrosis cística). Un total de 363 muestras dieron positivo en la comparación VersaTREK/ESP Culture System II/BACTEC 460, lo que representa un porcentaje de positividad del 12%. De estos cultivos positivos, 306 (84%) fueron recuperados en el instrumento del VersaTREK/ESP Culture System II y 268 (74%) fueron recuperados en el sistema BACTEC. En la comparación, todos los medios sólidos convencionales combinados detectaron un 92% de las muestras que desarrollaban micobacterias.

El instrumento del VersaTREK/ESP Culture System II indicó un 1,1% de falso positivo (señal positiva, no se detectan organismos) y un porcentaje del 0,6% de falso negativo (señal negativa, subcultivo AFB positivo). El porcentaje de falso negativo está basado en tinciones y/o subcultivos de todas las muestras positivas mediante cualquier método, más un 10% de las muestras negativas por los tres métodos. El porcentaje de contaminación inicial era del 8,8% y el final de 4,2%.

Se distribuyeron muestras positivas entre las siguientes fuentes de muestras: aparato respiratorio (72%), sangre (15%), heces (5%), tejidos (3,6%), fluidos estériles (2,2%), orina (1,4%) y herida (0,8%).

Se ha comprobado que el uso de probetas de ácido nucleico para la identificación de micobacterias directamente de un frasco positivo VersaTREK Myco es un método preciso y fiable.[5] Se comprobaron frascos VersaTREK Myco con (n=360) dos probetas AccuProbe en el día del resultado positivo, según se describe en el procedimiento. Las probetas utilizadas fueron determinadas mediante pigmentación de gránulos. Un gránulo de color amarillento fue comprobado con probetas específicas de complejo de *M. tuberculosis* y complejo *M. avium* (MAC), y un gránulo cromogénico fue comprobado con probetas específicas de MAC y *M. gordonae*. Los frascos que indicaron resultados equívocos de probeta fueron incubados a 35°C durante 1 a 3 días antes de efectuar una repetición de probeta. Los resultados del estudio se muestran en la Tabla 4. Siete organismos aislados fueron negativos para todas las probetas utilizadas y en última instancia fueron identificadas como otras especies micobacterianas.

TABLA 3. RESUMEN DE RESULTADOS CLÍNICOS

		Microorganismos recuperados por:				
ESPECIES de micobacterias	**TOTAL AISLADOS[a]**	**TOTAL VersaTREK/ ESP[b]**	**VersaTREK/ ESP, BACTEC, Y SÓLIDO**	**VersaTREK/ ESP SÓLO**	**BACTEC SÓLO**	**SÓLO SÓLIDO**
M. tuberculosis	68	62	52	1	1	4
M. avium-intracellulare	170	159	89	36[c,d]	2	3
M. kansasii	7	7	5	0	0	1
M. fortuitum	5	3	0	2	0	1
M. bovis	1	1	1	0	0	0
M. chelonae	9	8	4	0	0	0
M. gordonae	30	20	3	10[d]	0	4
M. scrofulaceum	1	0	0	0	0	1
M. xenopi	6	6	2	0	2	0
M. szulgai	3	3	3	0	0	0
M. species (otros)	8	7	1	2	1	1
TOTAL	**308**	**276**	**160**	**51[c, d]**	**6**	**15**

a. El número de organismos recuperados mediante cualquier método de las muestras comprobadas por los tres métodos.
b. El número total de organismos recuperados en el VersaTREK/ESP Culture System II.
c. p <0,05 para comparar entre VersaTREK/ESP y BACTEC utilizando la modificación de la prueba del chi cuadrado McNemar.
d. p <0,05 para comparar entre VersaTREK/ESP y medios sólidos utilizando la modificación de la prueba del chi cuadrado McNemar.

TABLA 4. COMPROBACIÓN DIRECTA DE FRASCOS VERSATREK/ESP MYCO POSITIVOS CON ACCUPROBES[a]

Organismo	**Total**	**Probeta inicial positiva**	**Probeta inicial equívoca**	**Probeta inicial negativa**	**Probeta positiva tras 2[da] prueba[b]**
Complejo *M. avium*					
Muestras sanguíneas	51	43 (84,3%)	8 (15,7%)	0	51 (100%)
Otras muestras	226	199 (88,1%)	24 (10,6%)	3 (1,3%)	226 (100%)
Complejo *M. tuberculosis*					
Muestras sanguíneas	1	1 (100%)	0	0	1 (100%)
Otras muestras	37	29 (78,4%)	6 (16,2%)	2 (5,4%)	37 (100%)
M. gordonae	38	37 (97,4%)	1 (2,6%)	0	38 (100%)
TOTAL	**353**	**310**	**38**	**5**	**353**

a. GenProbe, San Diego, CA
b. Fue necesario realizar pruebas repetidas múltiples para una identificación final de algunos organismos aislados. Para muestras MAC de origen sanguíneo, 1,96%. Para muestras MAC origen no sanguíneo, 1,33%. Para muestras *M. tuberculosis* de origen no sanguíneo, 5,4%.

INFORMACIÓN DE RIESGOS

VersaTREK Myco PVNA

Xn	Nocivo
R42/43	Posibilidad de sensibilización por inhalación y por contacto con la piel.
S26	En caso de contacto con los ojos, lávense inmediata y abundantemente con agua y acúdase a un médico.
S36	Úsese indumentaria protectora adecuada.

VersaTREK Myco AS

Xn	Harmful
R42/43	Posibilidad de sensibilización por inhalación y por contacto con la piel.
R48/23/24/25	Tóxico: riesgo de efectos graves para la salud en caso de exposición prolongada por inhalación, contacto con la piel e ingestión.
R45	Puede causar cáncer.
S7	Manténgase el recipiente bien cerrado.
S22	No respirar el polvo.
S24/25	Evítese el contacto con los ojos y la piel.
S26	En caso de contacto con los ojos, lávense inmediata y abundantemente con agua y acúdase a un médico.
S36	Úsese indumentaria protectora adecuada.
S45	En caso de accidente o malestar, acúdase inmediatamente al médico (si es posible, muéstresele la etiqueta).

BIBLIOGRAFÍA: pg. 7

Para obtener información adicional, llame al Servicio de Asistencia Técnica de TREK al número 1.800.642.7029.

Italiano

VersaTREK® Myco, 7111-42
VersaTREK Myco GS, 7112-42
VersaTREK Myco AS, 7114-42
VersaTREK Myco PVNA, 7113-42
VersaTREK Connector, 7150-44

USO PREVISTO
VersaTREK Myco, con aggiunto VersaTREK Myco GS e VersaTREK Myco AS o VersaTREK Myco PVNA, è un medium di crescita liquido selettivo per l'utilizzo sia con lo strumento VersaTREK sia con ESP Culture System II per il recupero in coltura di micobatteri provenienti da campioni corporei sterili e da campioni clinici fluidificati e decontaminati.

SOMMARIO E SPIEGAZIONE
Il laboratorio microbiologico è in grado di raccogliere un'ampia varietà di campioni per la coltura micobatterica. Tra questi possono essere inclusi campioni respiratori, sanguigni e altri liquidi corporei normalmente sterili, urina, feci, tessuti, e lavande gastriche. I metodi di coltura convenzionali riguardanti la fluidificazione e la concentrazione risultano efficaci nel rilevamento dei micobatteri; tuttavia, non sono disponibili risultati prima di 2 – 8 settimane. Sono infatti necessarie diverse settimane per completare il test di suscettibilità. Una diagnosi tempestiva di tubercolosi è necessaria per l'inizio di un'adeguata terapia farmacologia e al fine di adottare misure atte a prevenire la diffusione di tale disturbo a elevato contagio. Un intervento tardivo, in particolare delle specie resistenti a trattamento farmacologico multiplo *M. tuberculosis* (MDR-TB), può provocare un insuccesso nel trattamento e la morte del paziente. Per questi problemi, ai microbiologi clinici viene chiesto di utilizzare i test diagnostici più rapidi e sensibili in grado di fornire risultati attendibili[2]. Gli esperti dei Centri federali per il Controllo delle Malattie (CDC) hanno divulgato numerosi consigli riguardo i test micobatterici compreso l'utilizzo d medium sia solido che liquido per la coltura micobatterica[1].

VersaTREK/ESP Culture System II combina un medium di coltura liquido (VersaTREK Myco), con un supplemento di crescita (VersaTREK Myco GS) e, per i campioni potenzialmente contaminati, con un supplemento antibiotico (VersaTREK Myco AS o VersaTREK Myco PVNA) per un ottimale recupero dei micobatteri, con un sistema di rilevazione che procede all'incubazione automatica e al monitoraggio continuato dei flaconi di coltura inoculati con campioni sospetti o contenenti micobatteri. Le spugne nei flaconi di VersaTREK Myco forniscono una matrice di supporto alla crescita e aumentano l'area di superficie esposta all'ossigeno presente nella parte superiore dei flaconi. La tecnologia del VersaTREK/ESP Culture System II si basa sulla rilevazione delle variazioni di pressione nella parte superiore all'interno di un flacone sigillato. Il VersaTREK/ESP Culture System II monitora le variazioni della produzione e del consumo di gas dovute a crescita microbica. Per il rilevamento di micobatteri a crescita molto lenta è stato elaborato uno speciale algoritmo.

PRINCIPI DELLA PROCEDURA
I campioni adeguatamente preparati vengono inoculati con una siringa e un ago nei flaconi di VersaTREK Myco a cui è stato aggiunto VersaTREK Myco GS e, per campioni potenzialmente contaminati, VersaTREK Myco AS o VersaTREK Myco PVNA. È consigliabile utilizzare VersaTREK Myco PVNA in caso di ritardi previsti prima del trattamento superiori a 8 ore. Viene collegato VersaTREK Connector a ogni flacone per stabilire un percorso di monitoraggio sterile con lo strumento VersaTREK/ESP Culture System II Una membrana idrofobica nel VersaTREK Connector previene l'aerosolizzazione. Le informazioni cliniche vengono inserite nel computer del sistema, e quindi il flacone viene adeguatamente posto nello strumento per l'incubazione a 35 – 37 ° C in condizioni stabili.

VersaTREK/ESP Culture System II rileva crescite micobatteriche monitorando automaticamente (ogni 24 minuti) la velocità di consumo dell'ossigeno all'interno della parte alta del flacone di coltura registrando la segnalazione della crescita con un segnale visivo.

REAGENTI
Formula VersaTREK Myco *

(H2O)	Acqua trattata	11,5 ml
(MDK)	Terreno di coltura Middlebrook 7H9	0,56 % p/v
(CAS)	Casitone	0,12 % p/v
(GLY)	Glicerolo	0,24 % p/v
(SBC)	Bicarbonato di sodio	0,026 % p/v

VersaTREK Myco contiene anche delle spugne.

Formula VersaTREK Myco GS*

(H2O)	Acqua trattata	50 ml
(BSA)	Albumina di siero bovino	7,5% p/v
(DEX)	Destrosio	3,0% p/v
(OLA)	Acido oleico	0,09% v/v
(CAT)	Catalasi	0,003% p/v
(NaCl)	Cloruro di sodio	1,27% p/v

VersaTREK Myco AS e VersaTREK Myco PVNA contengono una miscela liofilizzata di agenti antimicrobici reidratati a 25 ml.

Formula VersaTREK Myco AS*

(H2O)	Acqua trattata	25 ml
(PXB)	Polimixina B	0,02% p/v
(AZL)	Azlocillina	0.0075% p/v
(FOS)	Fosfomicina	0,054% p/v
(NA)	Acido nalidixico	0,042% p/v
(AMB)	Amfotericina B	0,015% p/v
(STB)	Stabilizzatore	1% p/v
(FIL)	Riempitivo	7,7% p/v

Formula VersaTREK Myco PVNA*

(H2O)	Acqua trattata	25 ml
(PXB)	Polimixina B	0,02% p/v
(NA)	Acido nalidixico	0,06% p/v
(AMB)	Amfotericina B	0,015% p/v
(VAN)	Vancomicina	0,009% p/v
(SA)	Agente solubilizzante	5% p/v

*Modificati e/o integrati per soddisfare i criteri di prestazione.

PRECAUZIONI
1. Per l'utilizzo diagnostico *In Vitro*.

2. Fare riferimento alla documentazione per la sicurezza dei materiali VersaTREK Myco AS o VersaTREK Myco PVNA per informazioni complete sui rischi.

3. AVVERTENZA! CAMPIONE DI PROVA POTENZIALMENTE INFETTIVO. I campioni potrebbero contenere agenti infettivi. I reagenti contengono materiale di origine animale e sono quindi potenziali veicoli o trasmettitori di malattie. Per la manipolazione e lo smaltimento di agenti infettivi, attenersi alle normative istituzionali.

4. Lavorando con *M. tuberculosis* cresciuto in coltura, la raccomandazione è valida per le norme, le apparecchiature di contenimento, e le attrezzature di Livello di Sicurezza Biologica 3. [3]

5. Il VersaTREK Connector contiene un ago rientrante sterile subito dopo la rimozione del sigillo, ma potenzialmente contaminato subito dopo l'utilizzo.

Per la manipolazione e lo smaltimento di dispositivi contaminati con sangue, attenersi alle normative istituzionali. (Maneggiare con attenzione. Sterilizzare prima dello smaltimento Per lo smaltimento, utilizzare appositi contenitori per rifiuti con pericolo di lesione. Non riutilizzare.).

6. Verificare che nessun flacone presenti segni di contaminazione, rottura o altro segno di deterioramento. Non utilizzare flaconi dall'aspetto torbido o con segni di danneggiamento.

7. Utilizzare solo siringhe con sistema di bloccaggio ago.

8. Sterilizzare in autoclave tutti i flaconi di VersaTREK Myco prima dello smaltimento.

9. In caso di sigillo danneggiato, NON UTILIZZARE VersaTREK Connector ed eliminare nel contenitore per rifiuti con pericolo di lesione.

CONSERVAZIONE
VersaTREK Myco: Conservare a una temperatura di 15-30°C in luogo protetto dalla luce. NON CONGELARE. Il terreno di coltura dovrebbe essere incolore; non utilizzare se dall'aspetto torbido.

VersaTREK Myco GS: Conservare a una temperatura di 2-8°C in luogo protetto dalla luce.

VersaTREK Myco AS e VersaTREK Myco PVNA: Conservare a 2-8°C. In caso di reidratazione, conservare a 2-8°C e procedere all'utilizzo entro 5 giorni o parte, conservare a -20°C e procedere all'utilizzo entro 3 mesi. Una volta scongelato, non congelare nuovamente.

NORME PER LA RACCOLTA DEI CAMPIONI
Durante la valutazione clinica del VersaTREK/ESP Culture System II sono stati utilizzati campioni della seguente provenienza: respiratori (inclusi sputo, lavaggio, ecc.), liquidi corporei (come CSF, liquido sinoviale, liquido pleurico, ecc.), urina, feci, liquidi aspirati gastrici, tessuti, sangue, e midollo osseo. Raccogliere e trattare i campioni prelevati da diverse parti del corpo come descritto in *Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory*[3] e in *Clinical Microbiology Procedures Handbook*[4] o come descritto nel manuale di procedura del vostro laboratorio.

Nota: I campioni di midollo osseo e sangue devono essere trattati utilizzando una delle seguenti procedure prima dell'inoculazione dei flaconi di VersaTREK Myco:

1. Tubi Isolator: Seguire le istruzioni del fabbricante dell'Isolator per la lisi e la concentrazione. Inoculare VersaTREK Myco con 1 ml di sedimento.

2. Lisi di acqua distillata di cellule sanguigne intere:
a. Raccogliere 5-10 ml di sangue intero in un tubo Vacutainer sterile contenente Polianetol-sulfonato di sodio (SPS) o eparina (è preferibile un campione minimo di almeno 5 ml). Capovolgere il tubo più volte.
b. Trasferire l'intero campione in un tubo di centrifuga conico di 50 ml.
c. Aggiungere acqua distillata sterile fino all'indicatore di 40 ml del tubo. Questo darà origine alla lisi cellulare.
d. Centrifugare a 3000 x g per 20 minuti. Decantare il supernatante.
e. Aggiungere 1-2 ml di buffer fosfato al sedimento. Utilizzare 1 ml del campione risultante per inoculare VersaTREK Myco (#7 in basso).

3. Procedura di buffy-coat:
a. Utilizzare esclusivamente sangue raccolto in tubi contenenti SPS o eparina. Non è possibile utilizzare tubi contenenti Acido Edetico (EDTA) poiché tracce di EDTA potrebbero inibire la crescita micobatterica.
b. Ruotare il tubo a 1000 RPM per 10 minuti.
c. Utilizzando una pipetta, rimuovere il buffy coat e la più piccola quantità possibile di cellule sanguigne rosse. Porre in un tubo sterile. Utilizzare 1 ml del buffy coat per inoculare VersaTREK Myco (#7 in basso).

PROCEDURA
Materiali forniti:
VersaTREK Myco
VersaTREK Myco GS
VersaTREK Myco AS o VersaTREK Myco PVNA
VersaTREK Connector

Materiali richiesti ma non forniti:
Acqua distillata o deionizzata sterile.
Middlebrook 7H10 o altro agar micobatterico o medium a base di uovo.
Autoclave
Polvere di N-acetil-L-cisteina
0,067 M buffer fosfato sterile, pH 6,8
Centrifuga
Incubatrice alla CO_2, a 37°C
Siringhe sterili per tubercolina con aghi permanenti.
Pipette sterili (opzionali)
Disinfettante micobatterico (cioè, Amphyl™, OMNI™, ecc.)
Tamponi imbevuti di alcool
Mescolatore vortice
Tubi di centrifuga da 50 ml in polipropilene conici sterili
Cabina di sicurezza biologica
Microscopio
Materiali per la colorazione dei vetrini
Organismi con Controllo di Qualità:

M.tuberculosis ATCC® 25177	*M.kansasii* ATCC 12478
M.fortuitum ATCC 6841	*M.scrofulaceum* ATCC 19981
M.intracellulare ATCC 13950	

Inoculazione di Flaconi di Coltura VersaTREK Myco
1. Disinfettare il tappo del flacone VersaTREK Myco AS o VersaTREK Myco PVNA con alcool.

2. Ricostituire asetticamente VersaTREK Myco AS o VersaTREK Myco PVNA iniettando attraverso il setto disinfettato 25 ml di acqua deionizzata o distillata sterile utilizzando un ago e una siringa. La quantità di reagente consente di riempire 50 flaconi.

3. Etichettare il flacone di coltura VersaTREK Myco con le informazioni del paziente.

4. Disinfettare il tappo del flacone con alcool.

5. Aggiungere asetticamente 1 ml di VersaTREK Myco GS iniettando attraverso il setto con un ago e una siringa.

6. Aggiungere asetticamente 0,5 ml di soluzione di VersaTREK Myco o VersaTREK Myco PVNA iniettando attraverso il setto con un ago e una siringa.

7. Aggiungere fino a 1 ml di campione clinico concentrato con una ago e una siringa.
NOTA: Un eccessivo riempimento del flacone potrebbe dare luogo a risultati falsati con esito positivo e, nel caso di campioni sanguigni provenienti da tubi Isolator, inibire la crescita.

Inoculare 0,1 ml di campione su una piastra agar Middlebrook 7H10 o altro agar solido micobatterico o medium a base di uovo. [1]

NOTA: In alternativa, è possibile eseguire le fasi 2 e 5-7 aprendo i flaconi e aggiungendo i reagenti e i campioni utilizzando delle pipette sterili. Avere cura di mantenere la tecnica asettica. Il tappo deve essere adeguatamente rimesso in sede per garantire un sistema stagno. Se il tappo non è adeguatamente messo in sede, si verificherà una perdita dal flacone.

8. Strofinare il flacone di coltura e il tappo con disinfettante micobatterico.

9. Mescolare invertendo più volte.

10. Rimuovere il sigillo dal flacone di un VersaTREK Connector. Posizionare l'estremità dell'ago del VersaTREK Connector sul flacone di coltura e applicare una pressione verticale per praticare un foro nel tappo del flacone di coltura.

NOTA: Non capovolgere il flacone di coltura mentre VersaTREK Connector si trova sul flacone. Il liquido nell'ago può interferire con le letture della pressione del flacone.

11. Registrare le informazioni del paziente desiderate nel computer del VersaTREK/ESP Culture System II.

12. Posizionare il flacone di coltura con VersaTREK Connector nello strumento.

13. Quando lo strumento indica mediante una luce rossa fissa che un particolare flacone contiene una coltura positiva, rimuovere il flacone secondo le procedure specificate nel manuale dell'operatore VersaTREK/ESP Culture System II.

14. Lasciare svuotare il flacone mediante il VersaTREK Connector. In una cabina di sicurezza biologica, rimuovere il VersaTREK Connector dal flacone e smaltirlo in un apposito contenitore per rifiuti infetti con pericolo di lesione.

15. Agitare vorticosamente il campione per staccare gli organismi dalla spugna.

16. Una volta disinfettato il tappo del flacone, ricavare i campioni per la colorazione acido-resistente e la sottocoltura utilizzando una siringa e un ago. In caso di rinvenimento di organismi acido-resistenti sullo striscio, procedere con l'identificazione dell'organismo. In assenza di organismi sullo striscio, collegare un nuovo VersaTREK Connector, rimettere il flacone nello strumento VersaTREK/ESP Culture System II e proseguire con l'incubazione. In assenza di organismi acido-resistenti sullo striscio, è possibile sottoporre a ulteriore trattamento il contenuto del flacone durante un'altra procedura di decontaminazione e quindi inocularlo in un nuovo flacone VersaTREK Myco, o eliminarlo rendendo così necessario un altro campione.

17. L'identificazione degli organismi può avvenire utilizzando sonde ad acido nucleico (AccuProbe). Rimuovere 1,0 ml da un flacone ben mescolato di VersaTREK, centrifugare a 3500 x g per 15 minuti per concentrare la crescita (se l'isolato proviene da coltura sanguigna, è consigliabile risospendere il precipitato in 0,67M di buffer fosfato pH 6,8, agitare vorticosamente e centrifugare nuovamente. È consigliabile ripetere fino quando il supernatante risulta pulito). Risospendere i precipitato con terreno di coltura 7H9 a un equivalente McFarland 1 e analizzare utilizzando il kit AccuProbe (GenProbe, San Diego, CA) attenendosi alle istruzioni del fabbricante per il metodo di brodocoltura. È consigliabile ripetere il test del campione nel caso in cui il valore RLU sia compreso nell'intervallo indeterminato (10,000-29,000 RLUs).

18. Al termine del periodo di incubazione (6 settimane o quanto stabilito dal manuale di procedura del laboratorio), è consigliabile esaminare in modo visivo un flacone che non abbia dato risposta di crescita positiva per individuare la presenza di torbidità. Se il flacone si presenta torbido, ottenere un campione per la colorazione acido-resistente e la sottocoltura come descritto in precedenza. In mancanza di prova di torbidità, il flacone può essere eliminato. Prima dello smaltimento, sterilizzare il contenuto del flacone.

RISULTATI

La rilevazione della crescita micobatterica nel VersaTREK/ESP Culture System II si basa sulla misurazione sensibile della produzione e/o del consumo di gas all'interno della parte alta di un flacone di coltura stagno. Questa informazione è utilizzata per generare una curva per ogni flacone. Un algoritmo interno analizza le informazioni per stabilire lo stato di ogni campione. In presenza di determinate condizioni, un flacone viene etichettato come positivo. Sono presenti circa 10^6 CFU/ml di micobatteri al momento del rilevamento.

TABELLA 1. RAPPORTO SUI RISULTATI.

Stato del Flacone e della Macchia	Rapporto
Segnale+	AFB positivo;
Bacilli acido-resistenti + (AFB+)	Identificazione in sospeso
Segnale+	Assenza di rapporto; o campione contaminato con organismi non-micobatterici;
AFB -	impossibile stabilire la presenza/assenza di AFB

CONTROLLO DI QUALITÀ

Insieme a ogni lotto VersaTREK Myco è incluso un Certificato di Analisi. Tutti i lotti sono conformi ai criteri di garanzia di qualità TREK. Se richiesto, la procedura in basso può essere eseguita per test supplementari.

1. Aggiungere 1 ml VersaTREK Myco GS e 0,5 ml VersaTREK Myco AS o VersaTREK Myco PVNA reidratato in un flacone di coltura VersaTREK Myco.

2. Gli organismi QC possono essere utilizzati da aliquote congelate o medium solido. Preparare una sospensione in soluzione fisiologica sterile 0,85% corrispondente a McFarland standard No.1 (circa 10^7 CFU/ml). Lasciare depositare i grumi di organismo per 30 minuti. Diluire l'organismo a 10^4 CFU/ml in soluzione fisiologica sterile. Inoculare il flacone con 1 ml di organismo diluito.

TABELLA 2. RISULTATI PREVISTI DEL CONTROLLO DI QUALITÀ.

Organismo	ATCC®	CFU/ ml	Giorni a risultato positivo	Organismo	ATCC	CFU/ ml	Giorni a risultato positivo
M. tuberculosis	25177	10^4	<14	*M. kansasii*	12478	10^4	<14
M. fortuitium	6841	10^4	<14	*M. scrofulaceum*	19981	10^4	<14
M. intracellulare	13950	10^4	<14				

LIMITAZIONI

1. Il recupero di micobatteri nel flacone VersaTREK Myco dipende dalla qualità del campione raccolto, dal numero di organismi colturabili nel volume del campione, e dal metodo di trattamento. Per un ottimale recupero dei micobatteri è fondamentale attenersi alle istruzioni della procedura. La contaminazione con micobatteri saprofitici nell'acqua di rubinetto o altri reagenti e apparecchiature di laboratorio può provocare risultati positivi (ricupero di batteri ambientali al di fuori del campione clinico).

2. È consigliabile effettuare la decontaminazione con metodo N-acetil-L-Cisteina-Idrossido di Sodio (NALC-NaOH) o Acido Ossalico. Non sono stati testati altri metodi di decontaminazione in unione al medium di coltura VersaTREK Myco. I decontaminanti fluidificatori possono avere effetti nocivi sui micobatteri.

3. L'acido-resistenza dei micobatteri può variare a seconda del ceppo, del periodo della coltura e di altri fattori variabili. Tutti i flaconi con segnale positivo VersaTREK/ESP Culture System II o apparenza torbida dovrebbero essere sottoposti a sottocoltura con media micobatterico selettivo e non. Le specie non micobatteriche possono provocare un aumento eccessivo della presenza di micobatteri. È consigliabile decontaminare e sottoporre nuovamente a coltura questo tipo di flaconi di coltura.

4. I flaconi VersaTREK Myco con un segnale positivo possono contenere una o più specie di micobatteri e/o altre specie non-micobatteriche. L'identificazione dei micobatteri presenti richiede sottocoltura e procedure supplementari per identificare gli organismi presenti. La consistenza di morfologia microscopica nei flaconi VersaTREK Myco non è stata determinata.

5. I flaconi VersaTREK Myco vengono incubati a 35 – 37 °C, escludendo potenzialmente il ricupero di micobatteri che richiedano altre temperature di incubazione (cioè, *M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. haemophilum*). Il recupero di questi organismi richiede metodi di coltura supplementari. Non è possibile recuperare organismi con particolari requisiti di crescita (cioè, *M. haemophilum*) in VersaTREK Myco se incubati alla temperatura richiesta. In studi clinici e studi analitici si sono recuperati i seguenti isolati: *M. tuberculosis*, *M. avium-intracellulare*, *M. kansasii*, *M. fortuitum*, *M. bovis*, *M. chelonae*, *M. gordonae*, *M. scrofulaceum*, *M. xenopi*, *M. szulgai*, *M. phlei*, *M. smegmatis*, *M. simiae*, *M. marinum*, *M. malmoense*.

6. Il capovolgimento del flaconi VersaTREK Myco in seguito al collegamento di VersaTREK Connector può interferire con le letture della pressione del flacone ed è pertanto sconsigliato.

7. I risultati dl AccuProbe dovrebbero essere interpretati insieme ad altri dati clinici e di laboratorio disponibili presso il clinico. Un esito positivo di AccuProbe non esclude una coltura micobatterica mescolata.

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

VersaTREK/ESP Culture System II consente il recupero di micobatteri da campioni clinici. L'isolamento micobatterico nel VersaTREK/ESP Culture System II da 3001 campioni è stato confrontato con il sistema con terreno di coltura radiometrico BACTEC 460 in uno studio multicentro. È stato inoltre confrontato un sottogruppo del totale (2805 campioni) con i media convenzionali a base di uovo e agar. I laboratori che hanno partecipato allo studio erano geograficamente diffusi negli Stati Uniti e includevano ospedali privati e cliniche universitarie di diverse dimensioni con popolazioni varie di pazienti (compresi pazienti affetti da AIDS e Fibrosi Cistica). Un totale di 363 campioni sono risultati positivi nel confronto VersaTREK/ESP Culture System II/BACTEC 460 rappresentante un rapporto di positività del 12%. Di queste colture positive, 306 (84%) sono state recuperate nello strumento VersaTREK/ESP Culture System II e 268 (74%) nel sistema BACTEC. Nel confronto, tutti i media solidi convenzionali combinati hanno rilevato il 92% dei campioni che hanno riportato crescita micobatterica.

Lo strumento VersaTREK/ESP Culture System II ha dimostrato un rapporto positivo falsato di 1,1% (segnale positivo, assenza di organismo) e un rapporto negativo falsato 0,6% (segnale negativo, sottocoltura AFB positiva). Il rapporto negativo falsato si basa sulla colorazione e/o la sottocoltura di tutti i campioni positivi con qualsiasi metodo più il 10% dei campioni negativi con i tre metodi. Il rapporto di contaminazione iniziale era 8,8% mentre quello finale 4,2%.

I campioni positivi sono stati distribuiti tra le seguenti provenienze di campioni: respiratorio (72%), sangue (15%), feci (5%), tessuto (3,6%), liquidi sterili (2,2%), urina (1,4%), e ferita (0,8%).

È stato dimostrato che l'impiego di sonde nucleotidiche per l'identificazione micobatterica direttamente da un flacone positivo VersaTREK Myco fornisce risultati precisi e attendibili.[5] I flaconi positivi VersaTREK Myco (n=360) sono stati testati con due sonde AccuProbe il giorno del risultato positivo come descritto nella Procedura. Le sonde utilizzate sono state determinate da pigmentazione del precipitato. È stato testato un precipitato color camoscio con sonde specifiche per il complesso *M. tuberculosis* e il complesso *M. avium* (MAC), mentre è stato testato un precipitato cromogenetico con sonde specifiche per MAC e *M. gordonae*. I flaconi che hanno fornito risultati di sonda indeterminati sono stati incubati a 35°C per 1 – 3 giorni prima di eseguire una nuove ispezione con sonda. I risultati dello studio sono illustrati nella Tabella 4. Sette isolati sono risultati negativi a tutte le sonde utilizzate e alla fine sono stati identificati come altre specie di micobatteri.

TABELLA 3. SOMMARIO DEI RISULTATI CLINICI

		Microrganismi ricuperati da:				
Micobatterio: SPECIE	**TOTALE ISOLATI[a]**	**TOTALE VersaTREK/ ESP[b]**	**VersaTREK/ ESP, BACTEC, e SOLIDI**	**VersaTREK/ SOLO ESP**	**BACTEC SOLO**	**SOLIDO SOLO**
M. tuberculosis	68	62	52	1	1	4
M. avium-intracellulare	170	159	89	36[c,d]	2	3
M. kansasii	7	7	5	0	0	1
M. fortuitum	5	3	0	2	0	1
M. bovis	1	1	1	0	0	0
M. chelonae	9	8	4	0	0	0
M. gordonae	30	20	3	10[d]	0	4
M. scrofulaceum	1	0	0	0	0	1
M. xenopi	6	6	2	0	2	0
M. szulgai	3	3	3	0	0	0
M. species (other)	8	7	1	2	1	1
TOTALE	**308**	**276**	**160**	**51[c, d]**	**6**	**15**

a. Il numero di organismi recuperati con un metodo qualsiasi da campioni testati con i tre metodi.
b. Il numero complessivo di organismi recuperati nel VersaTREK/ESP Culture System II.
c. p <0,05 per il confronto tra VersaTREK/ESP e BACTEC utilizzando la modifica McNemar del test del chi quadrato.
d. p <0,05 per il confronto tra VersaTREK/ESP e media solido utilizzando la modifica McNemar del test del chi quadrato.

TABELLA 4. TEST DIRETTO DEL VERSATREK/ESP POSITIVO FLACONI MYCO CON ACCUPROBES[a]

Organismo	**Totale**	**Sonda iniziale positiva**	**Sonda iniziale indeterminata**	**Sonda iniziale negativa**	**Sonda Positiva dopo la controprova[b]**
Complesso *M. avium*					
Campioni di sangue	51	43 (84,3%)	8 (15,7%)	0	51 (100%)
Altri campioni	226	199 (88,1%)	24 (10,6%)	3 (1,3%)	226 (100%)
Complesso M. tuberculosis					
Campioni di sangue	1	1 (100%)	0	0	1 (100%)
Altri campioni	37	29 (78,4%)	6 (16,2%)	2 (5,4%)	37 (100%)
M. gordonae	38	37 (97,4%)	1 (2,6%)	0	38 (100%)
TOTALE	**353**	**310**	**38**	**5**	**353**

a. GenProbe, San Diego, CA
b. Sono state necessarie controprove multiple per l'identificazione finale di alcuni isolati. Per campioni MAC di sangue, 1,96%. Per campioni MAC di provenienza non sanguigna, 1,33%. Per campioni *M. tuberculosis* di provenienza non sanguigna, 5,4%.

INFORMAZIONI SUI RISCHI
VersaTREK Myco PVNA
Xn Nocivo
R42/43 Può provocare sensibilizzazione per inalazione e contatto con la pelle.
S26 In caso di contatto con gli occhi, lavare immediatamente e abbondantemente con acqua e consultare un medico.
S36 Usare indumenti protettivi adatti.

VersaTREK Myco AS
Xn Nocivo
R42/43 Può provocare sensibilizzazione per inalazione e contatto con la pelle.
R48/23/24/25 Tossico: pericolo di gravi danni alla salute in caso di esposizione prolungata per inalazione, a contatto con la pelle e per ingestione.
R45 Può provocare il cancro.
S7 Conservare il recipiente ben chiuso.
S22 Non respirare le polveri.
S24/25 Evitare il contatto con gli occhi e con la pelle.
S26 In caso di contatto con gli occhi, lavare immediatamente e abbondantemente con acqua e consultare un medico.
S36 Usare indumenti protettivi adatti.
S45 In caso di incidente o di malessere consultare immediatamente il medico (se possibile, mostrargli l'etichetta).

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI: pg. 7

Per maggiori informazioni, contattare l'Assistenza Tecnica di TREK al numero 1.800.642.7029.

Français

VersaTREK® Myco, 7111-42
VersaTREK Myco GS, 7112-42
VersaTREK Myco GS, 7114-42
VersaTREK Myco PVNA, 7113-42
VersaTREK Connector, 7150-44

UTILISATION PREVUE
VersaTREK Myco, avec VersaTREK Myco GS et VersaTREK Myco AS ou VersaTREK Myco PVNA, est un milieu de croissance sélectif à utiliser avec l'instrument VersaTREK ou le ESP Culture System II pour la récupération de mycobactéries dans des échantillons corporels stériles et dans des échantillons cliniques digérés, décontaminés.

RESUME ET EXPLICATION
Le laboratoire de microbiologie clinique peut recevoir une variété d'échantillons pour une mise en culture mycobactérienne. Ceci peut inclure des échantillons respiratoires, du sang et autres fluides corporels normalement stériles, de l'urine, des matières fécales, tissus et contenus gastriques. Les méthodes de culture conventionnelles impliquant la digestion et la concentration permettent la détection de mycobactéries, cependant les résultats ne sont pas disponibles avant 2 – 8 semaines. Quelques semaines supplémentaires sont nécessaires pour effectuer les tests de réceptivité. Un diagnostic rapide de la tuberculose est important pour introduire immédiatement la thérapie médicamenteuse adaptée et la prise de mesures destinées à prévenir la dissémination de cette maladie hautement contagieuse. Un traitement retardé, en particulier des souches résistantes aux thérapies médicamenteuses multiples comme *M. tuberculosis* (MDR-TB), peut avoir pour conséquence un échec du traitement et le décès du patient[2]. Pour contrer ces problèmes, les microbiologistes cliniques doivent de toute urgence utiliser les tests de diagnostic les plus rapides et les plus sensibles qui donnent des résultats crédibles. Les experts des centres de contrôle des maladies (CDC) ont fait diverses recommandations concernant les tests mycobactériens, y compris l'utilisation d'un milieu à la fois liquide et solide pour la culture mycobactérienne.[1]

VersaTREK/ESP Culture System II associe un milieu de culture liquide (VersaTREK Myco), un supplément de croissance (VersaTREK Myco GS) et pour les échantillons potentiellement contaminés, un supplément antibiotique (VersaTREK Myco AS ou VersaTREK Myco PVNA) pour une récupération optimale des mycobactéries, avec un système de détection qui incube automatiquement et surveille en permanence les flacons de culture inoculés d'échantillons que l'on suspecte d'être contaminés de mycobactéries. Les éponges placées dans les flacons VersaTREK Myco fournissent une matrice de support de croissance et augmentent la surface exposée à l'oxygène de la partie supérieure du flacon. La technologie du VersaTREK/ESP Culture System II se base sur la détection des modifications de pression dans la partie supérieure d'un flacon fermé. Le VersaTREK/ESP Culture System II surveille les modifications dans la production ou la consommation de gaz due à la croissance microbienne. Un algorithme spécial a été développé pour détecter les mycobactéries à croissance très lente.

PRINCIPES DE LA PROCEDURE
Les échantillons préparés de la manière appropriée sont inoculés par une seringue et une aiguille dans les flacons VersaTREK Myco auxquels on a ajouté du VersaTREK Myco GS et pour les échantillons potentiellement contaminés, VersaTREK Myco AS ou VersaTREK Myco PVNA. VersaTREK Myco PVNA devra être utilisé si l'on s'attend à des délais de plus de 8 heures avant traitement. Le VersaTREK Connector est attaché à chaque flacon pour établir une voie de surveillance stérile avec l'instrument VersaTREK/ESP Culture System II. Une membrane hydroponique placée dans le VersaTREK Connector empêche la formation d'aérosols. L'information clinique est introduite dans l'ordinateur du système et le flacon est placé correctement dans l'instrument pour incubation à 35 – 37 °C dans des conditions stationnaires.

VersaTREK/ESP Culture System II détecte la croissance mycobactérienne en surveillant automatiquement (toutes les 24 minutes) le taux de consommation d'oxygène dans la partie supérieure du flacon de culture et transmet cette réponse de croissance par un signal visible.

REACTIFS
Formule de VersaTREK Myco*

(H_2O)	Eau traitée	11.5 ml
(MDK)	Bouillon de culture 7H9 de Middlebrook	0.56 % w/v
(CAS)	Casitone	0.12 % w/v
(GLY)	Glycérol	0.24 % w/v
(SBC)	Bicarbonate de sodium	0.026 % w/v

VersaTREK Myco contient également des éponges.

Formule de **VersaTREK Myco GS***

(H_2O)	Eau traitée	50 ml
(BSA)	Albumine de sérum bovin	7.5% w/v
(DEX)	Dextrose	3.0% w/v
(OLA)	Acide oléique	0.09% v/v
(CAT)	Catalase	0.003% w/v
(NaCl)	Chlorure de sodium	1.27% w/v

VersaTREK Myco AS et VersaTREK Myco PVNA contiennent un mélange lyophilisé d'agents antimicrobiens qui sont réhydratés à 25 ml.

Formule de VersaTREK Myco AS*

(H_2O)	Eau traitée	25 ml
(PXB)	Polymyxine B	0,02% w/v
(AZL)	Azlocilline	0,0075% w/v
(FOS)	Fostomycine	0,054% w/v
(NA)	Acide nalidixique	0,042% w/v
(AMB)	Amphotéricine B	0,015% w/v
(STB)	Stabilisant	1% w/v
(FIL)	Filtre	7,7% w/v

Formule de VersaTREK Myco PVNA*

(H_2O)	Eau traitée	25 ml
(PXB)	Polymyxine B	0.02% w/v
(NA)	Acide nalidixique	0.06% w/v
(AMB)	Amphotéricine B	0,015% w/v
(VAN)	Vancomycine	0,009% w/v
(SA)	Agent diluant	5% w/v

*Les composants ou suppléments peuvent être ajustés pour répondre à des critères de performances.

PRECAUTIONS

1. Pour l'utilisation dans le diagnostic *in vitro*

2. Voir les fiches de sécurité de VersaTREK Myco AS ou VersaTREK Myco PVNA pour les informations complètes sur les dangers.

3. ATTENTI0N ! ECHANTILLON TEST POTENTIELLEMENT INFECTIEUX. Des agents infectieux peuvent être présents dans les échantillons. Les réactifs contiennent des matériaux d'origine animale et sont de ce fait des porteurs ou vecteurs potentiels de maladies. Respecter les précautions universelles et les règles professionnelles lors de la manipulation et de l'élimination des agents infectieux.

4. Pour travailler avec *M. tuberculosis* en culture, on recommande la pratique du niveau 3 de biosécurité, équipement de conteneur et autres dispositifs.[3]

5. Le VersaTREK Connector contient une aiguille pointue rétractable qui est stérile lors de l'enlèvement du conditionnement, mais potentiellement contaminée à la fin de l'utilisation.

Suivre les règles professionnelles de traitement et d'élimination des matériels contaminés par le sang. (Ne pas manipuler d'une manière « décontractée ». Stériliser avant d'éliminer. Eliminer dans un conteneur agréé pour les aiguilles. Ne pas réutiliser.)

6. Examiner visuellement les flacons à la recherche de contaminations, fissures ou autres signes de détérioration. Ne pas utiliser des flacons qui semblent opaques ou endommagés.

7. Utiliser uniquement des seringues à aiguille verrouillée.

8. Passer tous les flacons VersaTREK Myco dans l'autoclave avant de les éliminer.

9. Si l'étanchéité est hors d'usage, NE PAS UTILISER VersaTREK Connector et le déclasser dans un conteneur pour aiguilles.

ENTREPOSAGE
VersaTREK Myco : Conserver à 15-30°C, à l'abri de la lumière. NE PAS CONGELER. Les bouillons de culture doivent être incolores, ne pas les utiliser s'ils sont opaques.

VersaTREK Myco GS : Conserver à 2-8°C, à l'abri de la lumière.

VersaTREK Myco AS et VersaTREK Myco PVNA : Conserver à 2-8°C. Après réhydratation, conserver à 2-8°C et utiliser dans les 5 jours ou fractionner et entreposer à -20°C et utiliser dans les 3 mois. Une fois dégelé, ne pas recongeler.

PRINCIPES DE COLLECTE DES ECHANTILLONS
Les échantillons des sources suivantes ont été utilisés pendant l'évaluation clinique du VersaTREK/ESP Culture System II : respiratoire (y compris lavage, expectoration, etc.), fluides corporels (comme liquide céphalorachidien, liquide synovial, liquide pleural, etc.), urine, matières fécales, aspirations gastriques, tissus, sang et moelle osseuse. Collecter et traiter des échantillons de différents sites du corps comme mentionné dans *Public Health Mycobacteriology: A Guide for te Level III Laboratory*[3] et dans le *Clinical Microbiology Procedures Handbook*[4] ou suivant la description de notre manuel de procédure en laboratoire.

Note : les échantillons de moelle épinière doivent être traités en utilisant une des procédures suivantes avant d'inoculer les flacons VersaTREK Myco :

1. Tubes Isolator : Suivre les directives du fabricant de l'Isolator à propos de la lyse et de la concentration. Inoculer VersaTREK Myco avec 1 ml de sédiment.

2. Lyse dans l'eau distillée ou cellules sanguines entières :
   a. Mettre 5-10 ml de cellules sanguines entières dans un tube Vacutainer stérile contenant du polyanétholesulfonate de sodium (SPS) ou de l'héparine. (Un échantillon minimal d'au moins 5 ml est préférable). Renverser le tube plusieurs fois.
   b. Transférer tout l'échantillon dans un tube centrifuge conique de 50 ml.
   c. Ajouter de l'eau distillée jusqu'à la marque 40-ml sur le tube. Cela provoquera la lyse des cellules.
   d. Centrifuger à 3000 x g pendant 20 minutes. Décanter le surnageant.
   e. Ajouter 1-2 ml de tampon de phosphate au sédiment. Utiliser 1 ml de l'échantillon restant pour inoculer VersaTREK Myco (#7 ci-dessous)/
3. Procédure de couche tampon :
   a. Utiliser uniquement du sang reçu dans des tubes contenant du SPS ou de l'héparine. Les tubes contenant de l'acide ethylène-diamine-tétracétique (EDTA) sont inacceptables car même des traces d'EDTA inhibent la croissance mycobactérienne.
   b. Centrifuger le tube à 1000 tours/minute pendant 10 minutes.
   c. En utilisant une pipette, retirer la couche tampon et une quantité aussi faible que possible de globules rouges. Placer dans un tube stérile. Utiliser 1 ml de la couche tampon pour inoculer VersaTREK Myco (#7 ci-dessous).

PROCEDURE

Matériels fournis :
VersaTREK Myco :
VersaTREK Myco GS:
VersaTREK Myco AS et VersaTREK Myco PVNA
VersaTREK Connectors

Matériels nécessaires mais non fournis :
Eau stérile distillée ou déminéralisée
Milieu de Middlebrook 7H10 ou autre milieu à base de gélose ou d'albumine.
Autoclave
Poudre N-acetyl-L-cystéine
Tampon de phosphate stérile 0,067 M, pH 6,8
Centrifugeuse
Incubateur sous CO_2, 37°C
Seringue stérile tuberculinique avec aiguilles attachées en permanence
Pipettes stériles (en option)
Désinfectant mycobatéricide (par ex.Amphyl™, OMNI™, etc.)
Tampons d'alcool
Mélangeur Vortex
Tubes centrifuges coniques de 50-ml stériles
Armoire de sécurité biologique
Microscope
Matériaux pour lames de coloration
Organismes de contrôle de la qualité :

M.tuberculosis ATCC® 25177	*M.kansasii* ATCC 12478
M.fortuitum ATCC 6841	*M.scrofulaceum* ATCC 19981
M.intracellulare ATCC 13950	

Inoculation des flacons de culture VersaTREK Myco
1. Désinfecter le bouchon du flacon VersaTREK Myco AS ou VersaTREK Myco PVNA à l'alcool.

2. Reconstituer en milieu stérile VersaTREK Myco AS ou VersaTREK Myco PVNA en injectant 25 ml d'eau stérile distillée ou déminéralisée dans le septum, en utilisant une aiguille et une seringue. Il y a suffisamment de réactif pour 50 flacons.

3. Etiqueter la flacon de culture VersaTREK Myco en indiquant les informations du patient.

4. Désinfecter le bouchon du flacon à l'alcool.

5. Ajouter en milieu stérilez 1 ml de VersaTREK Myco GS en l'injectant par le septum en utilisant une seringue et une aiguille.

6. Ajouter en milieu stérile 0,5 ml de VersaTREK Myco AS ou VersaTREK Myco PVNA en l'injectant par le septum, en utilisant une seringue et une aiguille.

7. Ajouter jusqu'à 1 ml d'échantillon clinique concentré avec une seringue et une aiguille.
NOTE : Un remplissage exagéré du flacon peut provoquer des résultats positifs erronés, en cas d'échantillons de sang en tube Isolator, et peut provoquer une inhibition de la croissance.

Inoculer 0,1 ml de l'échantillon sur une lame à base d'agar-agar Middlebrook 7H10 ou autre gélose mycobactérienne solide ou milieu à base d'albumine.[1]

NOTE : Alternativement, les étapes 2 et 5-7 peuvent être effectuées en ouvrant les flacons et en ajoutant les réactifs et l'échantillon en utilisant des pipettes stériles. L'asepsie doit être maintenue tout au long du processus. Le bouchon et le capuchon doivent être réinstallés correctement pour garantir l'étanchéité du système. Si le bouchon et le capuchon ne sont pas replacés correctement, la flacon aura une fuite.

8. Essuyer le flacon de culture et le bouchon avec du désinfectant mycobactéricide.

9. Mélanger en renversant le tube plusieurs fois.

10. Retirer la fermeture du dessous du VersaTREK Connector. Placer l'extrémité de l'aiguille du VersaTREK Connector sur le goulot du flacon de culture et presser de bas en haut pour percer le bouchon du flacon.

NOTE : Ne pas renverser le flacon pendant que le VersaTREK Connector est sur le flacon. La présence de liquide dans l'aiguille peut interférer avec les résultats de pression du flacon.

11. Enregistrer les informations voulues du patient dans l'ordinateur du VersaTREK/ESP Culture System II.

12. Placer le flacon de culture avec le VersaTREK Connector dans l'instrument.

13. Quand l'instrument indique par un voyant témoin stable qu'un endroit particulier du flacon contient une culture positive, retirer le flacon en respectant les procédures spécifiées dans le manuel de l'opérateur du VersaTREK/ESP Culture System II.

14. Laisser le flacon s'éventer par le VersaTREK Connector. Dans une armoire de sécurité biologique, retirer le VersaTREK Connector du flacon et le jeter dans un conteneur de déchets infectieux agréé.

15. Centrifuger l'échantillon complètement pour déloger les organismes de l'éponge.

16. Quand le bouchon du flacon est désinfecté, obtenir des échantillons pour la coloration acide rapide et la sous-culture en utilisant une seringue et une aiguille. Si des organismes acides rapides sont découverts sur le frottis, procéder à l'identification des organismes. Si le frottis ne présente aucun organisme, attacher un nouveau VersaTREK Connector, remettre le flacon dans l'instrument VersaTREK/ESP Culture System II et poursuivre l'incubation. Si des organismes non-acides sont découverts sur le frottis, le contenu du flacon peut être retraité par une autre procédure de décontamination et inoculé dans un flacon frais VersaTREK Myco ou déclassé, avec prélèvement d'un nouvel échantillon.

17. L'identification des organismes peut être effectuée en utilisant des sondes d'acide nucléique (AccuProbe). Retirer 1.0 ml d'un flacon VersaTREK bien mélangé, centrifuger à 3500 x g pendant 15 minutes pour concentrer la croissance. (Si l'isolat provient d'une culture de sang, la pastille devrait de nouveau être mise en suspension dans un tampon de phosphate de 0.67M au pH 6.8 passé au Vortex et à la centrifugeuse. Cette procédure doit être répétée jusqu'à ce que le surnageant soit clair). Remettre en suspension des pastilles dans un bouillon de culture 7H9 jusqu'à un équivalent McFarland 1 et faire évaluer à l'aide d'un kit AccuProbe (GenProbe, San Diego, CA) suivant les instructions du fabricant pour la méthode de culture en bouillon de culture. Il est recommandé de re-tester l'échantillon si la valeur RLU entre dans la plage équivoque (10,000-29,000 RLUs).

18. A la fin de la période d'incubation (6 semaines ou celle définie par votre manuel de procédure de laboratoire), un flacon ne montrant pas de réponse de croissance positive doit être examiné visuellement pour voir s'il n'est pas opaque. Si le flacon est opaque, prendre un échantillon pour la coloration à l'acide rapide et la sous-culture comme décrit ci-dessus. Si l'on trouve des traces d'opacité, le flacon peut être déclassé. Stériliser le contenu des flacons avant d'éliminer.

RESULTATS

La détection de la croissance microbienne VersaTREK/ESP Culture System II se base sur la mesure sensible de la production et/ou la consommation de gaz dans la partie supérieure d'un flacon fermé. L'information est utilisée pour générer une courbe pour chaque flacon. Un algorithme interne analyse l'information pour déterminer l'état de chaque échantillon. Quand on atteint un certain ensemble de conditions, le flacon est considéré comme positif. Il y a environ 10^6 CFU/ml de mycobactéries au moment de la détection.

TABLEAU 1. RESULTATS

Etat frottis et flacon	Rapport
Signal+	AFB positif
Bacilles acide rapide + (AFB+)	Identification en cours
Signal+	Pas de rapport, ou échantillon
AFB -	contaminé par des organismes non-mycobactériens impossible de déterminer la présence ou l'absence de AFB

CONTROLE QUALITE

Un certificat d'analyse est inclus avec chaque lot VersaTREK Myco. Chaque lot est conforme aux critères de l'assurance qualité TREK. Si on le souhaite, la procédure ci-dessous peut être suivie pour effectuer un test supplémentaire.

1. Ajouter 1 ml VersaTREK Myco GS et 0.5 VersaTREK Myco AS réhydraté ou VersaTREK Myco PVNA dans un flacon de culture VersaTREK Myco.

2. Des organismes CQ peuvent être utilisés à partir de fractions congelés ou de milieux solides. Préparer une suspension dans une solution stérile saline à 0,85% équivalente à la norme McFarland n°1 (environ 10^7 CFU/ml). Laisser les rejets de l'organisme se déposer pendant 30 minutes. Diluer l'organisme dans une solution stérile saline de 10^4 CFU/ml. Inoculer 1ml d'organisme dilué dans la flacon.

TABLEAU 2. RESULTATS CQ ATTENDUS

Organisme	ATCC®	CFU/ ml	Jours pour devenir positifs	Organisme	ATCC®	CFU/ ml	Jours pour devenir positifs
M. tuberculosis	25177	10^4	<14	*M. kansasii*	12478	10^4	<14
M. fortuitium	6841	10^4	<14	*M. scrofulaceum*	19981	10^4	<14
M. intracellulare	13950	10^4	<14				

LIMITATIONS

1. La récupération de mycobactéries dans le flacon VersaTREK Myco dépend de la qualité de l'échantillon, du nombre d'organismes cultivables dans le volume de l'échantillon et de la méthode de traitement. Le respect des instructions de procédure est essentiel pour une récupération optimale des mycobactéries. La contamination par des mycobactéries saprophytiques dans l'eau du robinet ou autres réactifs et matériels de laboratoire peut provoquer des résultats positifs erronés (récupération de bactéries environnementales non présentes dans l'échantillon clinique).

2. La contamination par la méthode N-acétyl-L-cystéine / hydroxyde de sodium (NALC-NaOH) ou acide oxalique est recommandée. D'autres méthodes de décontamination ont été testées en parallèle avec le milieu de culture VersaTREK Myco. Des décontaminants digestifs peuvent avoir des effets néfastes sur les mycobactéries.

3. Les mycobactéries peuvent varier en ce qui concerne la rapidité acide suivant la souche, l'âge de la culture ainsi que d'autres variables. Tous les flacons au signal positif avec VersaTREK/ESP Culture System II ou apparaissant opaques doivent être mis en sous-culture dans des milieux mycobactériens à la fois sélectifs et non-sélectifs. Les espèces non-mycobactériennes peuvent supplanter les mycobactéries présentes. De tels flacons de culture doivent être décontaminés et remis en culture.

4. Les flacons VersaTREK Myco signalés positifs peuvent contenir une ou plusieurs espèces de mycobactéries et/ou d'autres espèces non mycobactériennes. L'identification des mycobactéries présentes nécessite la mise en sous-culture et des procédures complémentaires pour identifier les organismes présents. La constance de la morphologie microscopique dans les flacons VersaTREK Myco n'a pas été établie.

5. Les flacons VersaTREK Myco sont incubés à 35 – 37 °C, prévenant potentiellement la récupération de mycobactéries nécessitant d'autres températures d'incubation (par ex. *M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. haemophilum*). La récupération de ces types d'organismes demande des méthodes de culture complémentaires. Les organismes ayant des exigences spéciales de croissance (ex. : *M. haemophilum)* peuvent ne pas être récupérés dans VersaTREK Myco quand ils sont incubés à la température adéquate. Les isolats suivants ont été récupérés soit dans des études cliniques, soit dans des études analytiques : *M. tuberculosis*, *M. avium-intracellulare*, *M. kansasii*, *M. fortuitum*, *M. bovis*, *M. chelonae*, *M. gordonae*, *M. scrofulaceum*, *M. xenopi*, *M. szulgai*, *M. phlei*, *M. smegmatis*, *M. simiae*, *M. marinum*, *M. malmoense*.

6. Renverser les flacons VersaTREK Myco après avoir attaché le VersaTREK Connector peut interférer avec les valeurs de pression du flacon et n'est pas recommandé.

7. Les résultats d'AccuProbe devraient être interprétés en corollaire avec les autres données cliniques et de laboratoire accessibles au clinicien. Un résultat AccuProbe positif n'indique pas obligatoirement une culture mélangée de mycobactéries.

CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCES

Le VersaTREK/ESP Culture System II permet la récupération de mycobactéries dans les échantillons cliniques. L'isolation des mycobactéries dans 3001 échantillons avec le VersaTREK/ESP Culture System II a été comparée au système de bouillon de culture radiométrique BACTEC 460 dans une étude multicentres. Un sous-ensemble de 2805 échantillons a également été comparé au milieu conventionnel à base d'agar-agar ou d'albumine. Les laboratoires participant à l'étude étaient géographiquement situés dans tous les Etats-Unis et comprenaient des hôpitaux universitaires de grande et petite envergure, dont la population de patients variait (y compris les patients souffrant du SIDA et de fibrose cystique). Un total de 363 échantillons s'est avéré positif dans la comparaison VersaTREK/ESP Culture System II/BACTEC 460, ce qui représente un taux de positivité de 12%. Dans ces cultures positives, 306 (84%) ont été récupérées dans l'instrument VersaTREK/ESP Culture System II et 268 (74%) ont été récupérées dans le système BACTEC. Dans la comparaison, tous les milieux conventionnels solides combinés détectaient 92% des échantillons qui présentaient des mycobactéries.

L'instrument VersaTREK/ESP Culture System II a signalé 1.1% de faux positifs (signal positif, mais pas d'organismes) et 0.6% de faux négatifs (signal négatif, sous-culture AFB positive). Le taux de faux négatifs se base sur la coloration et/ou la mise en sous-culture de tous les échantillons positifs par toutes méthodes, plus 10% des échantillons négatifs par les trois méthodes. Le taux initial de contamination était de 8.8% et le final était de 4.2%.

Les échantillons positifs provenaient des sources d'échantillons suivantes : respiratoire (72%), sang (15%), matières fécales (5%), tissu (3.6%), fluides stériles (2.2%), urine (1.4%), et plaies (0.8%).

L'utilisation de sondes à acide nucléique pour l'identification des mycobactéries directement dans un flacon VersaTREK Myco positive a démontré sa précision et sa fiabilité.[5] Les flacons VersaTREK Myco positifs (n=360) ont été testés avec deux AccuProbe le jour où ils ont été signalés positifs, comme décrit dans la procédure. Les sondes utilisées ont été déterminées par la pigmentation de la pastille. Une pastille couleur chamois a été testée avec des sondes spécifiques pour le complexe *M. tuberculosis* et le complexe *M. avium* (MAC) alors qu'une pastille chromogénique a été testée avec des sondes spécifiques pour MAC et *M. gordonae.* Les flacons donnant des résultats de sondage équivoques ont été incubés à 35°C pendant 1 – 3 jours avant qu'un deuxième sondage soit effectué. Les résultats de l'étude sont indiqués dans le Tableau 4. Sept isolats étaient négatifs pour toutes les sondes utilisées et ont été finalement identifiés comme des espèces de mycobactéries.

TABLEAU 3. RESUME DES RESULTATS CLINIQUES

		Microorganismes récupérés par :				
Mycobactéries ESPECES	**TOTAL ISOLATS[a]**	**TOTAL VersaTREK/ ESP[b]**	**VersaTREK ESP, BACTEC, et SOLIDE**	**VersaTREK/ ESP, SEUL[T]**	**BACTEC SEUL[T]**	**SOLIDE SEUL[T]**
M. tuberculosis	68	62	52	1	1	4
M. avium-intracellulare	170	159	89	36[c,d]	2	3
M. kansasii	7	7	5	0	0	1
M. fortuitum	5	3	0	2	0	1
M. bovis	1	1	1	0	0	0
M. chelonae	9	8	4	0	0	0
M. gordonae	30	20	3	10[d]	0	4
M. scrofulaceum	1	0	0	0	0	1
M. xenopi	6	6	2	0	2	0
M. szulgai	3	3	3	0	0	0
M. species (other)	8	7	1	2	1	1
TOTAL	**308**	**276**	**160**	**51[c, d]**	**6**	**15**

a. Nombre d'organismes récupérés par toutes les méthodes au départ d'échantillons testés par les trois méthodes.
b. Nombre total d'organismes récupérés dans le VersaTREK/ESP Culture System II
c. p <0.05 pour la comparaison entre VersaTREK/ESP et BACTEC en utilisant la modification McNemar et le test du chi-carré.
d. p <0.05 pour la comparaison entre VersaTREK/ESP et les milieux solides en utilisant la modification McNemar et le test du chi-carré.

TABLEAU 4. TEST DIRECT DU VERSATREK/ESP POSITIF FLACONS MYCO AVEC ACCUPROBES[a]

Organisme	**TOTAL**	**Sonde initiale positive**	**Sonde initiale équivoque**	**Sonde initiale négative**	**Sonde positive après re-test[b]**
Complexe *M. avium*					
Echantillons de sang	51	43 (84.3%)	8 (15.7%)	0	51 (100%)
Autres échantillons	226	199 (88.1%)	24 (10.6%)	3 (1.3%)	226 (100%)
Complexe *M. tuberculosis*					
Echantillons de sang	1	1 (100%)	0	0	1 (100%)
Autres échantillons	37	29 (78.4%)	6 (16.2%)	2 (5.4%)	37 (100%)
M. gordonae	38	37 (97.4%)	1 (2.6%)	0	38 (100%)
TOTAL	**353**	**310**	**38**	**5**	**353**

a. GenProbe, San Diego, CA
b. De nombreux tests supplémentaires ont été nécessaires pour l'identification finale de certains isolats. Pour les échantillons de sang MAC, 1,96%. Pour les échantillons MAC autres que du sang, 1,33%. Pour les échantillons *M. tuberculosis* autres que du sang, 5,4%.

INFORMATIONS SUR LES RISQUES

VersaTREK Myco PVNA

Xn	Nocif
R42/43	Peut provoquer une sensibilité par inhalation et contact avec la peau.
S26	En cas de contact avec les yeux, rincer immédiatement et abondamment à l'eau puis consulter un médecin.
S36	Porter des vêtements de protection appropriés.

VersaTREK Myco AS

Xn	Nocif
R42/43	Peut provoquer une sensibilité par inhalation et contact avec la peau.
R48/23/24/25	Toxique : risque d'effets graves pour la santé en cas d'exposition prolongée par inhalation, par contact avec la peau et par ingestion.
R45	Peut causer le cancer.
S7	Conserver le récipient fermé.
S22	Ne pas inhaler les matières volatiles.
S24/25	Eviter le contact avec la peau et les yeux.
S26	En cas de contact avec les yeux, rincer immédiatement et abondamment à l'eau puis consulter un médecin.
S36	Porter des vêtements de protection appropriés.
S45	En cas d'accident ou de malaise, consulter immédiatement un médecin (lui montrer l'étiquette si possible).

RÉFÉRENCES: Page 7

Pour toute information complémentaire, appeler l’assistance technique TREK au 1.800.642.7029.

Português

VersaTREK® Myco, 7111-42
VersaTREK Myco GS, 7112-42
VersaTREK Myco AS, 7114-42
VersaTREK Myco PVNA, 7113-42
VersaTREK Connector, 7150-44

UTILIZAÇÃO PREVISTA
O VersaTREK Myco,Suplementado com VersaTREK Myco GS e VersaTREK Myco AS ou VersaTREK Myco PVNA, funciona como um meio líquido selectivo para utilização no Aparelho VersaTREK ou no ESP Culture System II , permitindo a recuperação de culturas de micobactérias a partir de amostras biológicas estéreis e de amostras clínicas descontaminadas.

RESUMO E EXPLICAÇÃO
O laboratório de microbiologia clínica poderá receber diferentes tipos de amostras para cultura micobacteriana. Estas podem incluir amostras respiratórias, de sangue e de outros fluidos corporais normalmente estéreis, tal como, urina, fezes, tecido e lavagens gástricas. Os métodos de cultura convencionais que envolvem a fluidificação e concentração permitem a detecção de micobactérias, no entanto, os resultados não estarão disponíveis durante 2 a 8 semanas. São necessárias várias semanas adicionais para concluir o teste de sensibilidade. O diagnóstico rápido da tuberculose é importante para dar início a uma terapia medicamentosa apropriada e para o estabelecimento de medidas de prevenção da disseminação desta doença altamente contagiosa. O tratamento tardio do *M. tuberculosis*, em particular de estirpes resistentes a múltiplos antibióticos, pode resultar numa falha do tratamento e na morte do doente.[2] De forma a obviar estas questões, os microbiologistas clínicos deverão utilizar os testes de diagnóstico mais rápidos e sensíveis que forneçam resultados fiáveis. Os peritos dos Centros de Controlo de Doença (CDC) publicaram várias recomendações relativamente ao teste para micobactérias, incluindo a utilização de meios líquidos e sólidos para cultura micobacteriana.[1]

O VersaTREK/ESP Culture System II combina um meio de cultura líquido (VersaTREK Myco), um suplemento de crescimento (VersaTREK Myco GS) e, para amostras potencialmente contaminadas, um suplemento antibiótico (VersaTREK Myco AS ou VersaTREK Myco PVNA).Esta combinação actuando num sistema de detecção que incuba automaticamente e monitoriza continuamente garrafas de cultura, permite a recuperação eficaz de micobactérias, nas amostras suspeitas de conter micobactérias. Os tampões nas garrafas VersaTREK Myco fornecem uma matriz de suporte de crescimento e aumentam a área de superfície exposta ao oxigénio do espaço livre. A tecnologia do VersaTREK/ESP Culture System II é baseada na detecção das alterações de pressão do espaço livre numa garrafa selada. O VersaTREK/ESP Culture System II monitoriza as alterações na produção de gás e consumo de gás provocadas pelo crescimento microbiológico. Foi desenvolvido um algoritmo especial para detecção de micobactérias de crescimento lento.

PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO
As amostras depois de correctamente preparadas são inoculadas com uma agulha e seringa e uma agulha nas garrafas Myco VersaTREK previamente preparadas com VersaTREK Myco GS e, para amostras potencialmente contaminadas, com VersaTREK Myco AS ou VersaTREK Myco PVNA. O VersaTREK Myco PVNA deverá ser utilizado quando forem esperados atrasos superiores a 8 horas antes do processamento. O VersaTREK Connector é fixado a cada garrafa para estabelecer uma via esterilizada de monitorização no aparelho VersaTREK/ESP Culture System II. Uma membrana hidrofóbica no VersaTREK Connector evita a produção de aerossóis. A informação clínica é introduzida no computador do sistema e a garrafa é colocada no aparelho para incubação a 35 – 37 °C, em condições estáveis.

O VersaTREK/ESP Culture System II detecta o crescimento micobacteriano monitorizando automaticamente (a cada 24 minutos) a taxa de consumo de oxigénio no espaço livre da garrafa de cultura e reportando essa resposta de crescimento através de um sinal visível.

REAGENTES
Fórmula VersaTREK Myco *

(H2O)	Água Destilada Estéril	11,5 ml
(MDK)	Caldo Middlebrook 7H9	0,56 % peso/volume
(CAS)	Casitona	0,12 % peso/volume
(GLY)	Glicerol	0,24 % peso/volume
(SBC)	Bicabornato de Sódio	0,026 % peso/volume

O VersaTREK Myco também contém tampões.

Fórmula VersaTREK Myco GS*

(H2O)	Água Destilada Estéril	50 ml
(BSA)	Albumina Sérica Bovina	7,5% peso/volume
(DEX)	Dextrose	3,0% peso/volume
(OLA)	Ácido Oleico	0,09% peso/volume
(CAT)	Catalase	0,003% peso/volume
(NaCl)	Cloreto de Sódio	1,27% peso/volume

O VersaTREK Myco AS e VersaTREK Myco PVNA contêm uma mistura liofilizada de agentes antibióticos que são re-hidratados para 25 ml.

Fórmula VersaTREK Myco AS*

(H2O)	Água Destilada Estéril	25 ml
(PXB)	Polimixina B	0,02% peso/volume
(AZL)	Azlocilina	0,0075% peso/volume
(FOS)	Fosfomicina	0,054% peso/volume
(NA)	Ácido Nalidíxico	0,042% peso/volume
(AMB)	Anfotericina B	0,015% peso/volume
(STB)	Estabilizador	1% peso/volume
(FIL)	Enchimento	7,7% peso/volume

Fórmula VersaTREK Myco PVNA*

(H2O)	Água Destilada Estéril	25 ml
(PXB)	Polimixina B	0,02% peso/volume
(NA)	Ácido Nalidíxico	0,06% peso/volume
(AMB)	Anfotericina B	0,015% peso/volume
(VAN)	Vancomicina	0,009% peso/volume
(SA)	Agente de Solubilização	5% peso/volume

*Ajustada e/ou suplementada para corresponder aos critérios de comportamento funcional.

PRECAUÇÕES
1. Para Utilização em Diagnóstico *In Vitro*.

2. Consulte as Fichas de Segurança do Material VersaTREK Myco AS ou VersaTREK Myco PVNA para informações completas sobre os riscos.

3. AVISO! AMOSTRA DE TESTE POTENCIALMENTE INFECCIOSA. Pode haver agentes infecciosos nas amostras. Os reagentes que contêm material de origem animal e similares são potenciais portadores ou transmissores de doença. Siga as Precauções Universais e a política institucional de manipulação e eliminação de agentes infecciosos.

4. No trabalho com culturas de *M. tuberculosis*, recomendam-se as práticas, equipamento de contenção e instalações de Nível 3 de Biosegurança, [3]

5. O VersaTREK Connector contém uma agulha afiada encastrada e esterilizada aquando da remoção do selo, mas potencialmente contaminada no final da sua utilização.

Siga a política institucional para manipulaçãoe eliminação de dispositivos contaminados com sangue. (Não manipular de forma inadvertida. Esterilizar antes de eliminar. Eliminar num contentor aprovado para objectos contundentes. Não reutilizar.)

6. Inspeccione visualmente todas oas garrafas no que respeita a contaminação, fissuras ou outros sinais de deterioração. Não utilize garrafas que se apresentem turvas ou com fissuras.

7. Utilize apenas seringas com bloqueio de agulha.

8. Proceda à autoclavagem de todas as garrafas VersaTREK Myco antes da eliminação.

9. Se o selo tiver sido violado, NÃO UTILIZE o VersaTRECK connector e elimine-o num contentor para objectos contundentes.

ARMAZENAMENTO
VersaTREK Myco: Conservar entre 15º e 30°C. Proteger da exposição solar. NÃO CONGELAR. O caldo deverá ser incolor; não utilizar se parecer turvo.

VersaTREK Myco GS: Conservar entre 2º a 8°C. Proteger da exposição solar.

VersaTREK Myco AS e VersaTREK Myco PVNA: Conservar entre 2º e 8°C. Depois de re-hidratado , conservar entre 2º e 8°C e utilizar dentro de 5 dias ou alíquotare conservar a
-20°C , utilizar dentro de 3 meses. Depois de descongelado, não voltar a congelar.

PRINCÍPIOS DA COLHEITA DE AMOSTRAS
Foram utilizadas amostras dos seguintes tipos de produtos durante a avaliação clínica do VersaTREK/ESP Culture System II: respiratórias (incluindo expectoração, lavagens, etc.), fluidos corporais (como LCR, líquido sinovial, fluido pleural, etc.), urina, fezes, aspiração gástrica, tecidos, sangue e medula óssea. Colha e processe as amostras a partir de diferentes locais do corpo como descrito em *Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory*[3] e em *Clinical Microbiology Procedures Handbook*[4] ou como descrito no manual de procedimentos laboratorial.

Nota: As amostras de sangue e medula óssea só poderão ser processadas utilizando
um dos seguintes procedimentos antes da inoculação das garrafas VersaTREK Myco:

1. Tubos isoladores: Siga as instruções do fabricante do isolador para lise e concentração. Inocular o VersaTREK Myco com 1 ml de sedimento.

2. Lise de todas as células sanguíneas em água destilada:
a. Recolha de 5 a 10 ml de sangue total para um tubo Vacutainer esterilizado contendo Polianetolsulfonato de Sódio (SPS) ou heparina. (De preferência uma amostra mínima de, pelo menos, 5 ml)inverta o tubo diversas vezes.
b. Transfira a amostra total para um tubo de centrífuga cónico de 50 ml.
c. Adicione água destilada esterilizada ao tubo até à marca de 40 ml. Isto provocará a lise das células.
d. Centrifugue a 3000 x g durante 20 minutos. Decante o sobrenadante.
e. Adicione 1 a 2 ml de tampão de fosfato ao sedimento. Utilize 1 ml da amostra resultante para inocular o VersaTREK Myco (N.º 7 em baixo).

3. Procedimento para a camada leucocitária:
a. Utilize apenas sangue colhido em tubos que contenham SPS ou heparina. Os tubos que contenham Ácido Edético (EDTA) não são aceitáveis, uma vez que qualquer vestígio de EDTA inibe o crescimento micobacteriano.
b. Centrifugue o tubo a 1000 RPM durante 10 minutos.
c. Utilizando uma pipeta, remova a camada leucocitária e o mínimo de glóbulos vermelhos possível. Coloque num tubo esterilizado. Utilize 1 ml de camada leucocitária para inocular o VersaTREK Myco (N.º 7 em baixo).

PROCEDIMENTO
Materiais Fornecidos:
VersaTREK Myco
VersaTREK Myco GS
VersaTREK Myco AS ou VersaTREK Myco PVNA
VersaTREK Connector

Materiais Necessários Mas Não Fornecidos:
Água destilada estéril ou desionizada
Middlebrook 7H10 ou outro meio micobacteriano com base de ovo
Autoclave
N-acetil-L-cisteína em pó
Tampão de fosfato M 0.067 esterilizado, pH 6,8
Centrífuga
Incubador de CO_2, 37 °C
Seringas de tuberculina esterilizadas com agulhas fixas permanentes
Pipetas Esterilizadas (opcional)
Desinfectante micobactericida (por exemplo, Amphyl™, OMNI™, etc.)
Tampões de álcool
Misturador vórtex
Tubos centrífugos de polipropileno cónicos de 50 ml esterilizados
Câmara de fluxo laminar
Microscópio
Materiais de coloração para lâminas
Microrganismos de Controlo de Qualidade:

M.tuberculosis ATCC® 25177	*M.kansasii* ATCC 12478
M.fortuitum ATCC 6841	*M.scrofulaceum* ATCC 19981
M.intracellulare ATCC 13950	

Inoculação de Garrafas de Cultura VersaTREK Myco
1. Desinfecte a tampa da garrafa VersaTREK Myco AS ou VersaTREK Myco PVNA com álcool.

2. Reconstitua assepticamente o VersaTREK Myco AS ou VersaTREK Myco PVNA injectando 25 ml de água esterilizada destilada ou desionizada através do septo desinfectado utilizando uma agulha e uma seringa. Obterá reagente suficiente para 50 garrafas.

3. Identifique com uma etiqueta a garrafa de cultura VersaTREK Myco com a informação do doente.

4. Desinfecte a tampa da garrafa com álcool.

5. Adicione assepticamente 1 ml de VersaTREK Myco GS injectando através do septo com uma agulha e seringa.

6. Adicione assepticamente 0,5 ml de solução VersaTREK Myco AS ou VersaTREK Myco PVNA injectando através do septo com uma agulha e seringa.

7. Adicione 1 ml de amostra biológica concentrada com uma agulha e seringa.
NOTA: O sobreenchimento significativo da garrafa poderá originar resultados positivos falsos e, no caso de amostras de sangue de tubos isoladores, pode levar a uma inibição do crescimento.

Inocule 0,1 ml de amostra numa placa de agar Middlebrook 7H10 ou outro meio sólido micobacteriano com base de ovo

NOTA: Alternativamente, as etapas 2 e 5 a 7 podem ser efectuados abrindo as garrafas e adicionando os reagentes e a amostra, utilizando pipetas esterilizadas. Deverá ter o cuidado de manter a técnica asséptica. A tampa e cápsula devem ser devidamente encaixadas, de forma a garantir um sistema estanque. Se a tampa e a cápsula não forem encaixadas devidamente, irá ocorrer um erro de fuga na garrafa.

8. Limpe a garrafa de cultura e a tampa com desinfectante micobactericida.

9Homogeneíze invertendo várias vezes.

10. Remova o selo do fundo de um VersaTRECK Connector. Coloque a extremidade da agulha do conector sobre o gargalo da garrafa de cultura e force para baixo de forma a perfurar a tampa da garrafa.

NOTA: Não inverta a garrafa de cultura enquanto o VersaTREK Connector está na garrafa. O fluido na agulha pode interferir com as leituras de pressão da garrafa.

11. Registe a informação do doente no computador VersaTREK/ESP Culture System II.

12. Coloque a garrafa de cultura com o VersaTREK Connector no aparelho.

13. Quando o aparelho indicar através de uma luz vermelha fixa que uma determinada localização de garrafa contém uma cultura positiva, remova a garrafa de acordo com os procedimentos especificados no Manual do Utilizador do VersaTREK/ESP Culture System II.

14. Deixe que a garrafa ventile através do VersaTREK Connector. Numa câmara de fluxo laminar, remova o VersaTREK Connector da garrafa e elimine-o num contentor aprovado para resíduos infecciosos contundentes.

15. Agite vigorosamente em Vortex a amostra para soltar os microrganismos dos tampões.

16. Depois da tampa da garrafa ter sido desinfectada, recolha amostras para coloração ácido-álcool resistente e subcultura utilizando uma agulha e seringa. Se forem encontrados microrganismos ácido-resistentes na colheita, proceda à identificação do microrganismo. Se não forem encontrados microrganismos na colheita, fixe um novo VersaTREK Connector, volte a colocar a garrafa no Aparelho VersaTREK/ESP Culture System II e prossiga com a incubação. Se forem encontrados microrganismos não ácido-resistentes na colheita, o conteúdo da garrafa pode voltar a ser descontaminado e inoculado numa garrafa VersaTREK Myco nova ou eliminado, sendo solicitada nova amostra.

17. A identificação de microrganismo poderá ser determinada utilizando sondas de ácido nucleico (AccuProbe). Remova 1,0 ml de um frasco VersaTREK bem homogeneizado, centrifugue a 3500 x g durante 15 minutos para concentrar o caldo. (Se o isolado resultar de uma cultura de sangue,o sedimento (pellet) será ressuspendido em tampão de fosfato 0.67M pH 6,8, agitado e recentrifugado. Esta operação deverá ser repetida até o sobrenadante ficar limpo.) Ressuspenda o sedimento (pellet) com caldo 7H9 para um equivalente a McFarland 1 e analise utilizando o AccuProbe (GenProbe, San Diego, CA) seguindo as instruções do fabricante relativamente ao método de cultura em caldo. É recomendado que, no caso do valor RLU se encontrar num intervalo duvidoso (10.000 a 29.000 RLU), a amostra seja novamente testada.

18. No final do período de incubação (6 semanas ou como definido pelo manual de procedimentos laboratoriais), uma garrafa que não for assinalada positiva deve ser visualmente inspeccionada relativamente à turvação. Se a garrafa estiver turva, retire uma amostra para a coloração ácido-resistente e subcultura, como descrito em cima. Se não houver turvação, a garrafa pode ser eliminada. Esterilize o conteúdo da garrafa antes da eliminação.

RESULTADOS

A detecção de crescimento microbiológico no VersaTREK/ESP Culture System II baseia-se na medição sensível da produção de gás e/ou consumo de gás dentro do espaço livre de uma garrafa de cultura selado. Esta informação é utilizada para criar uma curva para cada garrafa. Um algoritmo interno analisa a informação, de forma a determinar o estado de cada amostra. Quando um determinado conjunto de condições é cumprido, uma garrafa é assinalada positiva. Existem aproximadamente 10^6CFU/ml de micobactérias na altura da detecção.

TABELA 1. REPORTAR RESULTADOS

Relatório de Estado do Frasco e	Colheita
Sinal+	AFB positivo;
Bacilos ácido resistentes + (AFB+)	identificação pendente
Sinal+	Sem relatório, ou amostra contaminada com organismos não micobacterianos;
AFB -	não é possível determinar a presença/ausência de AFB

CONTROLO DE QUALIDADE

Um Certificado de Análise é incluído em cada lote VersaTREK Myco. Cada lote está em conformidade com os critérios de certificação de qualidade da TREK. Se necessário, o procedimento em baixo pode ser cumprido para testes adicionais.

1. Adicione 1 ml de VersaTREK Myco GS e 0,5 ml de VersaTREK Myco AS ou VersaTREK Myco PVNA re-hidratado à garrafa de cultura VersaTREK Myco.

2. Os microrganismos de CQ podem ser utilizados a partir de alíquotas congeladas ou meio sólido. Prepare a suspensão equivalente ao padrão1 McFarland (aproximadamente 10^7 CFU/ml) numa solução salina 0,85% esterilizado . Deixe a suspensão de microrganismos repousar durante 30 minutos. Dilua a suspensão em 10^4 CFU/ml de salina esterilizada. Inocule o frasco com 1 ml de da diluição.

TABELA 2. RESULTADOS DE QC ESPERADOS

Microrganismo	ATCC®	CFU/ ml	Dias para Positivo	Microrganismo	ATCC	UFC/ ml	Dias para Positivo
M. tuberculosis	25177	10^4	<14	*M. kansasii*	12478	10^4	<14
M. fortuitium	6841	10^4	<14	*M. scrofulaceum*	19981	10^4	<14
M. intracellulare	13950	10^4	<14				

LIMITAÇÕES

1. A recuperação de micobactérias na garrafa VersaTREK Myco depende da qualidade da amostra recolhida, do número de microrganismos cultiváveis no volume da amostra e do método de processamento. O cumprimento das instruções de procedimento é imprescindível para uma boa recuperação das micobactérias. A contaminação com micobactérias saprófitas presentes na água corrente ou noutros reagentes e equipamento de laboratório pode originar resultados positivos (recuperação de bactérias ambientais não presentes na amostra biológica).

2. É recomendada a descontaminação pelo Hidróxido de Sódio N-Acetil-L-Cisteína (NALC-NaOH) ou método de Ácido Oxálico. Os restantes métodos de descontaminação não foram testados com o meio de cultura VersaTREK Myco. Os descontaminantes digestivos podem ter efeitos nocivos nas micobactérias.

3. As micobactérias podem variar na sua capacidade ácido-resistente dependendo da estirpe, idade da cultura e outras variáveis. Todas as garrafas com um sinal VersaTREK/ESP Culture System II positivo ou que se apresentem turvas devem ser subcultivadas nos meios micobacterianos selectivos e não selectivos. As contaminações podem ser superiores à quantidade de micobactérias presentes. Essas garrafas de cultura devem ser descontaminadas e recultivadas.

4. As garrafas VersaTREK Myco com um sinal positivo podem conter uma ou mais espécies de micobactérias e/ou outras espécies não micobacterianas. A identificação de micobactérias presentes requer uma subcultura e procedimentos adicionais para identificação dos microrganismos presentes. A consistência da morfologia microscópica em garrafas VersaTREK Myco não foi estabelecida.

5. As garrafas VersaTREK Myco são incubadas a 35 – 37 °C, eliminando, potencialmente, a recuperação de micobactérias que necessitem de outras temperaturas de incubação (p. ex., *M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. haemophilum*). A recuperação desses microrganismos requer métodos de cultura adicionais. Os microrganismos com requisitos de crescimento especiais (p. ex., *M. haemophilum*) podem não ser recuperados no VersaTREK Myco mesmo quando incubados à temperatura adequada. Os seguintes isolados foram recuperados em estudos clínicos ou estudos analíticos: *M. tuberculosis*, *M. avium-intracellulare*, *M. kansasii*, *M. fortuitum*, *M. bovis*, *M. chelonae*, *M. gordonae*, *M. scrofulaceum*, *M. xenopi*, *M. szulgai*, *M. phlei*, *M. smegmatis*, *M. simiae*, *M. marinum*, *M. malmoense*.

6. A inversão das garrafas VersaTREK Myco após a conexão do VersaTREK Connector pode interferir com as leituras de pressão da garrafa e não é recomendada.

7. Os resultados do AccuProbe devem ser interpretados em conjunto com outros dados laboratoriais e clínicos disponíveis. Um resultado AccuProbe positivo não elimina a probabilidade de cultura micobacteriana mista.

CARACTERÍSTICAS DE COMPORTAMENTO FUNCIONAL

O VersaTREK/ESP Culture System II permite a recuperação de micobactérias de amostras biológicas. O isolamento de micobactérias no VersaTREK/ESP Culture System II de 3001 amostras foi comparado com o sistema radiométrico BACTEC 460 num estudo multi-centro. Um subconjunto do total (2805 amostras) também foi comparado com o meio convencional de agar com base de ovo. Os laboratórios que participaram no estudo estavam distribuídos geograficamente pelos EUA e incluíram grandes e pequenos hospitais privados e universitários com diferentes populações de pacientes (incluindo pacientes com SIDA e Fibrose Cística). Um total de 363 amostras foi positivo na comparação entre o VersaTREK/ESP Culture System II/BACTEC 460, representando uma taxa de positividade de 12%. De entre estas culturas positivas, 306 (84%) foram recuperadas no aparelho VersaTREK/ESP Culture System II e 268 (74%) foram recuperadas no sistema BACTEC. Na comparação, todos os meios sólidos convencionais combinados detectaram 92% das amostras que desenvolveram micobactérias.

O Aparelho VersaTREK/ESP Culture System II demonstrou uma taxa de 1,1% falsos positivos (sinal positivo, sem microrganismos observados) e de 0,6% falsos negativos (sinal negativo, subcultura AFB positiva). A taxa de falsos negativos baseia-se na coloração e/ou subcultura de todas as amostras positivas obtidas através de qualquer um dos métodos, mais 10% das amostras negativas nos três métodos. A taxa de contaminação inicial foi de 8,8% e a final de 4,2%.

As amostras positivas foram distribuídas pelos seguintes tipos de amostras: respiratória (72%), sangue (15%), fezes (5%), tecido (3,6%), fluidos estéreis (2,2%), urina (1,4%) e feridas (0,8%).

A utilização de sondas de ácido nucleico para identificação de micobactérias directamente de uma garrafa VersaTREK Myco positiva foi reconhecida como precisa e fiável.[5] As garrafas VersaTREK Myco positivas (n=360) foram testadas com duas sondas AccuProbe no dia da positividade, tal como descrito no Procedimento. As sondas utilizadas foram determinadas pela pigmentação do sedimento ("pellet"). Um sedimento ("pellet") amarelado foi testado com sondas específicas para complexo *M. tuberculosis* e complexo *M. avium* (MAC), enquanto que um sedimento ("pellet") cromogénico foi testado com sondas específicas para MAC e *M. gordonae*. As garrafas que apresentaram resultados de sonda duvidosos foram incubados a 35°C durante 1 a 3 dias antes da repetição do ensaio . Os resultados do estudo são apresentados na Tabela 4. Sete isolados foram negativos para todas as sondas utilizadas e foram, por fim, identificados como outras espécies de micobactérias.

TABELA 3. RESUMO DOS RESULTADOS CLÍNICOS

		Microrganismos Recuperados por:				
Mycobacterium ESPÉCIE	**TOTAL ISOLADOS[a]**	**TOTAL VersaTREK/ ESP[b]**	**VersaTREK/ ESP, BACTEC, e SÓLIDO**	**VersaTREK/ ESP APENAS**	**BACTEC APENAS**	**SÓLIDO APENAS**
M. tuberculosis	68	62	52	1	1	4
M. avium-intracellulare	170	159	89	36[c,d]	2	3
M. kansasii	7	7	5	0	0	1
M. fortuitum	5	3	0	2	0	1
M. bovis	1	1	1	0	0	0
M. chelonae	9	8	4	0	0	0
M. gordonae	30	20	3	10[d]	0	4
M. scrofulaceum	1	0	0	0	0	1
M. xenopi	6	6	2	0	2	0
M. szulgai	3	3	3	0	0	0
Espécies M. (outras)	8	7	1	2	1	1
TOTAL	**308**	**276**	**160**	**51[c, d]**	**6**	**15**

a. O número de microrganismos recuperado por qualquer método de amostras testadas pelos três métodos.
b. O número total de microrganismos recuperado no VersaTREK/ESP Culture System II.
c. p <0,05 por comparação entre o VersaTREK/ESP e BACTEC, utilizando a modificação McNemar do teste qui-quadrado.
d. p <0,05 por comparação entre o VersaTREK/ESP e meios sólidos, utilizando a modificação McNemar do teste qui-quadrado.

TABELA 4. TESTE DIRECTO DE VERSATREK/ESP POSITIVO GARRAFAS MYCO COM ACCUPROBE[a]

Microrganismo	**Total**	**Sonda Inicial Positiva**	**Sonda Inicial duvidosa**	**Sonda Inicial Negativa**	**Sonda Positiva Após Novo Teste[b]**
Complexo M. avium					
Amostras de sangue	51	43 (84,3%)	8 (15,7%)	0	51 (100%)
Outras amostras	226	199 (88,1%)	24 (10,6%)	3 (1,3%)	226 (100%)
Complexo M. tuberculosis					
Amostras de sangue	1	1 (100%)	0	0	1 (100%)
Outras amostras	37	29 (78,4%)	6 (16,2%)	2 (5,4%)	37 (100%)
M. gordonae	38	37 (97,4%)	1 (2,6%)	0	38 (100%)
TOTAL	**353**	**310**	**38**	**5**	**353**

a. GenProbe, San Diego, CA
b. Múltiplos novos testes foram necessários para uma identificação final de alguns isolados. Para amostras MAC do sangue, 1,96%. Para amostras MAC de outros produtos para além do sangue, 1,33%. Para amostras de *M. tuberculosis* de outros produtos para além do sangue, 5,4%.

INFORMAÇÃO DE RISCO
VersaTREK Myco PVNA

Xn	Nocivo
R42/43	Pode causar sensibilização por inalação e em contacto com a pele.
S26	Em caso de contacto com os olhos, lavar imediata e abundantemente com água e consultar um médico.
S36	Usar vestuário de protecção adequado.

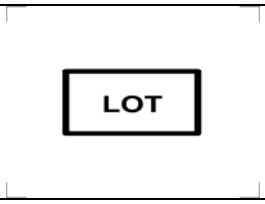
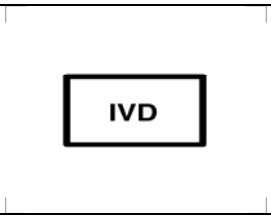
VersaTREK Myco AS

Xn	Nocivo
R42/43	Pode causar sensibilização por inalação e em contacto com a pele.
R48/23/24/25	Tóxico: risco de efeitos graves para a saúde em caso de exposição prolongada por inalação, em contacto com a pele e por ingestão.
R45	Pode causar cancro.
S7	Manter o recipiente bem fechado.
S22	Não respirar as poeiras.
S24/25	Evitar o contacto com a pele e olhos.
S26	Em caso de contacto com os olhos, lavar imediata e abundantemente com água e consultar um médico.
S36	Usar vestuário de protecção adequado.
S45	Em caso de acidente ou de indisposição, consultar imediatamente o médico (mostre-lhe o rótulo logo que possível).

REFERÊNCIAS: Página 7

Para informações adicionais contacte o Apoio Técnico da TREK através do 1.800.642.7029.

Symbols / Símbolos/ Simboli / Symboles/ Símbolos

	GB ES IT FR PT	Batch code Código de lote Codice del lotto Code du lot Código do grupo	
	GB ES IT FR PT	Catalogue number Número de catálogo Numero di catalogo Référence du catalogue Número de catálogo	
	GB ES IT FR PT	Manufacturer Fabricante Fabbricante Fabricant Fabricante	
	GB ES IT FR PT	Consult instructions for use Consulte las instrucciones de uso Consultare le istruzioni per l'uso Consulter les instructions d'utilisation Consulte instruções para o uso	
	GB ES IT FR PT	Temperature limitation Límite de temperatura Limiti di temperatura Limites de température Limitação de temperatura	
	GB ES IT FR PT	Use By Fecha de caducidad Utilizzare entro Date de péremption Uso perto	YYYYMMDD/YYYYMM (MM=end of month) aaaammdd/aaaamm (mm=fin del mes) AAAAMMGG/AAAAMM (MM=fine mese) AAAAMMJJ/AAAAMM (MM=fin de mois) YYYYMMDD/YYYYMM (MM= fim do mês)
	GB ES IT FR PT	In Vitro Diagnostic Medical Device Producto sanitario para diagnóstico in vitro Dispositivo medico-diagnostico in vitro Dispositif médical de diagnostic in vitro In Vitro Dispositivo Médico Diagnóstico	
	GB ES IT FR PT	Contains sufficient for <n> tests Contenido suficiente para <n> ensayos Contenuto sufficiente per <n> saggi Contenu suffisant pour <n> tests Contem suficiente para <n> testes	

EC REP	GB ES IT FR PT	Authorized Representative in the European Community Representante autorizado en la Comunidad Europea Mandatario nella Comunità Europea Mandataire dans la Communauté européenne Representante autorizado na Comunidade Europeia
	GB ES IT FR PT	Keep away from heat Mantener alejado de fuentes de calor Tenere lontano dal calore Conserver à l'abri de la chaleur Manter afastado do calor
CONT	GB ES IT FR PT	Contains Contiene Contiene Contient Contém
USE	GB ES IT FR PT	For use with the VersaTREK and ESP II Systems to cultivate and detect mycobacteria Para utilizar con los Sistemas VersaTREK y ESP II para cultivar y detectar micobacterias Da usare con i sistemi VersaTREK e ESP II Systems per coltivare rilevare micobatteri À utiliser avec les Systèmes VersaTREK et ESP II pour cultiver et détecter les mycobactéries Para utilização com os sistemas VersaTREK e ESP II para cultura e detecção de micobactérias
(H2O)	GB ES IT FR PT	Processed Water Agua procesada Acqua trattata Eau traitée Água processada
(MDK)	GB ES IT FR PT	Middlebrook 7H9 Broth Caldo Middlebrook 7H9 Terreno di coltura Middlebrook 7H9 Bouillon de culture 7H9 de Middlebrook Caldo Middlebrook 7H9
(CST)	GB ES IT FR PT	Casitone Casitona Casitone Casitone Casitona
(GLY)	GB ES IT FR PT	Glycerol Glicerol Glicerolo Glycérol Glicerol

(SBC)	GB ES IT FR PT	Sodium Bicarbonate Bicarbonato sódico Bicarbonato di sodio Bicarbonate de sodium Bicabornato de Sódio
(BSA)	GB ES IT FR PT	Bovine Serum Albumin Albúmina de suero bovino Albumina di siero bovino Albumine de sérum bovin Albumina Sérica Bovina
(DEX)	GB ES IT FR PT	Dextrose Dextrosa Destrosio Dextrose Dextrose
(OLA)	GB ES IT FR PT	Oleic Acid Ácido oleico Acido oleico Acide oléique Ácido Oleico
(CAT)	GB ES IT FR PT	Catalase Catalasa Catalasi Catalase Catalase
(NaCl)	GB ES IT FR PT	Sodium Chloride Cloruro sódico Cloruro di sodio Chlorure de sodium Cloreto de Sódio
(PXB)	GB ES IT FR PT	Polymyxin B Polimixina B Polimixina B Polymyxine B Polimixina B
(AZL)	GB ES IT FR PT	Azlocillin Azlocilina Azlocillina Azlocilline Azlocilina
(FOS)	GB ES IT FR PT	Fosfomycin Fosfomicina Fosfomicina Fostomycine Fosfomicina

(NA)	GB ES IT FR PT	Nalidixic Acid Ácido nalidíxico Acido nalidixico Acide nalidixique Ácido Nalidíxico
(AMB)	GB ES IT FR PT	Amphotericin B Anfotericina B Amfotericina B Amphotéricine B Anfotericina B
(VAN)	GB ES IT FR PT	Vancomycin Vancomicina Vancomicina Vancomycine Vancomicina
(STB)	GB ES IT FR PT	Stabilizer Estabilizante Stabilizzatore Stabilisant Estabilizador
(FIL)	GB ES IT FR PT	Filler Relleno Riempitivo Filtre Enchimento
(SA)	GB ES IT FR PT	Solubilizing Agent Agente solubilizante (Agente solubilizzante Agent diluant Agente de Solubilização